

**Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro Tecnológico  
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de  
Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química**

**Eliane Forgiarini**

**Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Pela  
Enzima *Horseradish* Peroxidase (HRP)**

Florianópolis – Santa Catarina  
Fevereiro/ 2006

**Eliane Forgiarini**

**Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Pela  
Enzima *Horseradish* Peroxidase (HRP)**

**Dissertação de Mestrado Submetida ao Programa de Pós –  
Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico, da  
Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em  
Engenharia Química.**

**Orientadora: Profa. Dra. Selene M. A. Guelli Ulson de Souza**

**Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza**

Florianópolis – Santa Catarina  
Fevereiro/ 2006

*“Houve um tempo em que se fazia ciência a partir de quatro elementos: água, terra, fogo e ar. Naquele tempo não se sabia que era possível fazer qualquer coisa com dois: vontade e imaginação...”* (Autor desconhecido).

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter sido minha rocha e fortaleza, nos bons e maus momentos da minha vida.

A minha família, em especial aos meus pais e irmãos, por apoiarem meus sonhos, acreditarem na minha capacidade, pelo suporte financeiro e por me amarem sempre.

Ao Guilherme, pelos comentários sempre oportunos, confortantes e incentivadores, e principalmente por seu amor e pelo seu apoio nas horas de desânimo.

A Heloisa, por ter despertado em mim o interesse pela pesquisa, pela disponibilidade em me ajudar a resolver os problemas sempre com muita disposição e alegria.

Aos Professores Selene M. A. Guelli Ulson de Souza e Antônio Augusto Ulson de Souza, pela Orientação e Confiança.

Ao Professor Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero, por ter sempre me atendido prontamente quando precisei de ajuda.

A Professora Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte, pelos ensinamentos e contribuição para a confecção deste trabalho.

Aos amigos Ana Cláudia, Fabiane, Kátia, Alexandre, Davi, Jucélio, Lorena, Samir, André, pela troca de idéias e pela agradável convivência.

A CAPES, pelo auxílio financeiro através da bolsa de estudos.

A FINEP/ Fundo Verde Amarelo/ Projeto PROTÊXTIL, pelo financiamento do projeto, juntamente com as empresas, MARISOL, KARSTEN e HERING.

A todos vocês, muito obrigada.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>5</b>
2.1 Objetivo geral .....	5
2.2 Objetivos específicos:.....	5
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>6</b>
3.1. Indústria Têxtil .....	6
3.1.1 O uso da água na indústria têxtil .....	7
3.1.2 Processo Têxtil .....	8
3.1.3 Beneficiamento Têxtil. ....	9
3.1.4 Produtos Químicos Auxiliares Utilizados na Indústria Têxtil.....	14
3.1.5 Corantes Têxteis .....	16
3.2 Geração e Tratamento de Efluentes Têxteis.....	21
3.4 Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis por Enzimas Lignolíticas .....	32
3.5 Enzimologia Aplicada à Indústria Têxtil.....	43
3.5.1 Nomenclatura e classificação das enzimas.....	43
3.5.2 Sítio ativo de ligação/ especificidade .....	45
3.5.3 Cofatores.....	46
3.5.4 Cinéticas de reações enzimáticas.....	46
3.5.5 Fatores externos que influenciam na velocidade de uma reação enzimática .....	49
3.5.6 Atividade Enzimática .....	50
3.5.7 Isoenzimas .....	51
3.5.8 Imobilização de Enzimas.....	51
3.6 Enzimas peroxidases .....	52
3.7 Toxicidade dos efluentes têxteis.....	57
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
4.1 Local .....	59
4.2 Material.....	59
4.2.1 Corantes .....	59
4.2.2 Efluente Têxtil .....	60
4.2.3 Enzima .....	61
4.3 Métodos .....	61
4.3.1 Determinação da atividade enzimática da <i>Horseradish</i> Peroxidase (HRP- Toyobo do Brasil).....	61
4.3.3 Determinação da cor pelo método espectrofotométrico.....	64
4.4 Testes de Toxicidade .....	64
4.4.1 Teste de toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i> .....	64
4.4.2 Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> .....	65
4.4.3 Teste de inibição do crescimento de raiz de cebola ( <i>Allium cepa</i> ) .....	65
4.5 Estudo cinético da degradação enzimática de corantes isolados e do efluente têxtil.....	66
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
5.1 Tratamento enzimático de corantes têxteis.....	68

5.1.1 Degradação Enzimática do Corante Turqueza Remazol G 133% .....	69
5.1.2 Avaliação da toxicidade aguda do corante Turqueza Remazol G 133%.....	75
5.1.3 Degradação Enzimática do Corante Azul Lanaset 2R .....	79
5.1.4 Avaliação da Toxicidade aguda do corante Azul Lanaset 2R.....	82
5.1.5 Degradação Enzimática do Corante Preto Remazol B .....	85
5.2 Degradação enzimática de efluentes têxteis .....	86
5.2.1 Avaliação da toxicidade aguda do efluente têxtil.....	91
<b>6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....</b>	<b>98</b>
A seguir são apresentadas algumas sugestões para desenvolvimento de trabalhos futuros:.....	
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>100</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas características do processamento a úmido de tecidos de algodão e mesclas de algodão (Fonte: EPA, 1997). .....	10
Figura 2 : Estrutura química de um azo corante. ....	18
Figura 3: Interação do corante reativo com a fibra têxtil .....	19
Figura 4: Organograma das classes de tratamento de efluentes.....	25
Figura 5: Estrutura química do sulfofenil hidroperóxido .....	39
Figura 6 – Modelo chave / fechadura. ....	45
Figura 7 – Modelo de Ajuste Induzido. ....	46
Figura 8 – Cinética enzimática .....	48
Figura 9 : Ciclo catalítico da peroxidase .....	52
Figura 10 – Grupo prostético das enzimas peroxidase denominado grupo <i>heme</i> . ...	54
Figura 11 - Estrutura química dos corantes utilizados neste trabalho.....	60
Figura 12 - Espectrofotômetro Shimadzu UV mini -1240. ....	62
Figura 13 – Reação da Siringaldazina catalisada pela enzima.....	62
Figura 14 – Medidor de pH Quimis. ....	63
Figura 15 - Espectro de varredura do corante Turqueza, antes e após o tratamento com a enzima HRP livre.....	69
Figura 16 - Efeito da quantidade de peróxido de hidrogênio, na descoloração do corante Turqueza G 133%, pela enzima HRP.....	70
Figura 17 - Influência da temperatura na descoloração do corante Turqueza Remazol G 133%, pela enzima HRP livre.....	71
Figura 18 - Efeito do pH sobre a ação da HRP, na remoção de cor. ....	72
Figura 19 - Efeito da quantidade de enzima HRP livre, na remoção de corante. ...	73
Figura 20 - Efeito da concentração de corante na solução catalisada pela HRP.....	74
Figura 21 – Descoloração do corante Turqueza G 133%, com diferentes quantidades de enzima. ....	75
Figura 22 - Teste de toxicidade aguda para o microcrustáceo <i>Artemia salina</i> após 24 horas de exposição em diferentes concentrações de corante não tratado. ....	77
Figura 23 - Teste de toxicidade aguda para o microcrustáceo <i>Artemia salina</i> após 24 horas de exposição em diferentes concentrações de corante tratado com a enzima HRP. ....	77
Figura 24 – Descoloração do Corante Azul 2R, pela enzima HRP. ....	80
Figura 25 - Porcentagem de corante removido com HRP livre em função do tempo de contato. ....	81
Figura 26 - Cinética de descoloração do Corante Azul 2R, em função do tempo e adição do substrato.....	82
Figura 27 – Teste de toxicidade aguda para o microcrustáceo <i>Artemia Salina</i> , após 24 horas de exposição em diferentes concentrações do corante Azul 2R antes do tratamento. ....	83
Figura 28 – Teste de toxicidade aguda para o microcrustáceo <i>Artemia Salina</i> , após 24 horas de exposição em diferentes concentrações do corante Azul 2R após o tratamento enzimático.....	84
Figura 29 - Espectro de varredura do corante Preto Remazol B, antes e após 45 minutos de tratamento com a enzima HRP. ....	86
Figura 30 - Espectro de absorção do tratamento de efluente têxtil com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , enzima e enzima + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (O efluente foi diluído 1:1) por 90 minutos.....	87

Figura 31 - Espectros de absorção do efluente têxtil, após tratamento enzimático em diferentes temperaturas por 90 minutos. ....	88
Figura 32 - Efeito da temperatura, na descoloração do efluente têxtil.....	88
Figura 33: Espectros de absorção do efluente têxtil, ilustrando a formação de um novo pico, e a redução do mesmo em função do tempo. ....	90
Figura 34 - Descoloração do efluente têxtil, temperatura 30°C, pH 5,0. Com primeira adição e segunda adição de enzima.....	90
Figura 35 - Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo <i>Artemia salina</i> , após 24 horas de exposição, em diferentes concentrações de efluente não tratado.....	92
Figura 36 - Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo <i>Artemia salina</i> , após 24 horas de exposição, em diferentes concentrações de efluente tratado com a enzima HRP. ....	93
Figura 37 - Teste de toxicidade aguda para o microcrustáceo <i>D. magna</i> , após 48 horas de exposição em diferentes concentrações de efluente não tratado com enzima. ....	94
Figura 38 - Teste de toxicidade aguda para o microcrustáceo <i>D.magna</i> , após 48 horas de exposição em diferentes concentrações de efluente tratado por processos enzimáticos. ....	94
Figura 39 - Crescimento da raiz de cebola em diferentes concentrações de efluente tratado. ....	96



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Auxiliares químicos utilizados em tingimento. ....	16
Tabela 2: Valores mais prováveis de alguns efluentes líquidos têxteis.....	23
Tabela 3. Enzimas com potenciais aplicação em tratamento de Resíduos.....	34
Tabela 4 - Propriedades da enzima <i>Horseradish</i> peroxidase.....	61
Tabela 5: Testes de Toxicidade aguda com o microcrustáceo <i>Artemia salina</i> , após 24 horas de incubação em diferentes concentrações de corante. ....	76
Tabela 6 - Inibição do crescimento da raiz de cebola ( <i>Allium cepa</i> ), exposta a 8 dias em diferentes concentrações de corante bruto e após tratamento enzimático. ....	78
Tabela 7: Testes de Toxicidade aguda com o microcrustáceo <i>Artemia salina</i> , após 24 horas de incubação em diferentes concentrações de corante. ....	83
Tabela 8 - Inibição do crescimento da raiz de cebola ( <i>Allium cepa</i> ), exposta a 8 dias em diferentes concentrações de corante bruto e após tratamento enzimático. ....	85
Tabela 9: Testes de Toxicidade aguda com o microcrustáceo <i>Artemia salina</i> , após 24 horas de incubação em diferentes concentrações de efluente.....	92
Tabela 10 - Resultado de <i>Daphnia magna</i> expostas no efluente têxtil bruto e tratado (n=10 em duplicata). ....	93
Tabela 11: Inibição do crescimento da raiz de cebola ( <i>Allium cepa</i> ), expostas a 8 dias em diferentes concentrações de efluente bruto e após tratamento. ....	96

## RESUMO

Este trabalho apresenta uma avaliação do potencial da enzima vegetal *Horseradish* peroxidase (HRP), para a descoloração de corantes e efluentes têxteis. As condições ótimas de atuação da HRP (29,85 U/mL), pH, quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e enzima, concentração de corante e temperatura foram encontradas através de ensaios realizados com o corante Turqueza Remazol G 133%. Os ensaios de descoloração com os demais corantes estudados e com o efluente têxtil foram realizados a partir desses resultados. As condições ótimas de atuação da enzima determinadas foram: pH na faixa de 4,0 a 5,0, quantidade de enzima de 5x10<sup>-3</sup> mL de enzima/ mL de solução (29,85 U/mL) e 2x10<sup>-3</sup> mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, concentração de corante a ser tratado em 100mg/L e temperatura de 30°C. Dentre os corantes testados, os resultados indicaram que a descoloração do corante Turqueza Remazol G133% foi de aproximadamente 59% em 45 minutos de contato com a enzima; para o Azul Lanaset 2R, a descoloração alcançou cerca de 94% em apenas 5 minutos, enquanto que, para o Preto Remazol B, não houve nenhuma descoloração superior a 10%. Nos ensaios de descoloração do efluente têxtil obteve-se 52% de eficiência. Neste caso, foi observada a formação de um novo pico entre os comprimentos de onda 350 – 450 nm, que não interferiu no cálculo da eficiência da descoloração, pois este foi realizado através da área do espectro de varredura. Além da descoloração foi feita a avaliação da toxicidade, antes e após o tratamento enzimático dos corantes e do efluente têxtil, empregando-se os microcrustáceos *Artemia salina* e *Daphnia magna* e inibição do crescimento da raiz de cebola (*Allium cepa*). A avaliação da toxicidade dos corantes têxteis evidenciou uma toxicidade mais elevada após o tratamento enzimático, o que pode ser explicado pela formação de compostos intermediários mais tóxicos que o composto de partida. A toxicidade do efluente têxtil apresentou uma redução após o tratamento enzimático, frente a todos os testes avaliados. Os resultados obtidos neste trabalho indicaram a viabilidade do emprego de enzimas para descoloração de corantes e efluentes têxteis.

Palavras chave: Enzima, *Horseradish* peroxidase (HRP), Corantes têxteis, Efluentes têxteis, Toxicidade

## ABSTRACT

This work presents an evaluation of the potential of the vegetal enzyme *Horseradish* peroxidase (HRP), for the decolorization of dyes and textile effluent. The excellent conditions of performance of the HRP (29.85 U/mL), pH, amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and enzyme, concentration of dyes and temperature have been found through experiments realized with the dye Turqueza Remazol G 133%. The decolorization experiments of other dyes and the textile effluent have been realized using these results. The optimal conditions of the best performance of the enzyme have been: pH between 4.0 the 5.0, amount of enzyme of 5x10<sup>-3</sup> mL of enzyme/mL of solution (29.85 U/mL) and 2x10<sup>-3</sup> mmol L<sup>-1</sup> of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, initial dye concentration of 100 mg/L and temperature of 30°C. For the tested dyes, the results have indicated that the decolorization of Turqueza Remazol G133% dye was of approximately 59% in 45 minutes of contact time with the enzyme; for the Blue Lanaset 2R, the decolorization reached about 94% in only 5 minutes, while that for the Black Remazol B did not have any decolorization superior to 10%. In the experiments realized for decolorization of the effluent textile, 52% of efficiency was gotten. In this case, it was observed the formation of new peak between the wave lengths 350 and 450, which did not alter the calculation of the decolorization efficiency, because this was carried through the specter area. Beyond the decolorization, the evaluation of the toxicity was made, before and after the enzymatic treatment of the dyes and the textile effluent, using the microcrustaceans *Artemia salina* and *Daphnia magna* and growth inhibition of onion root (*Allium cepa*). The toxicity evaluation of the textile dyes evidenced a higher toxicity after the enzymatic treatment, which can be explained by the formation of more toxic intermediate compound than the initial compound. The effluent textile toxicity presented a reduction after the enzymatic treatment, for all evaluated tests. The results have indicated the viability of the enzyme application for decolorization of dyes and textile effluents.

Keywords: Enzyme, *Horseradish* peroxidase (HRP), Textile dyes, Textile effluents, Toxicity.

## 1 INTRODUÇÃO

As atividades industriais cresceram muito nos últimos anos, gerando novos problemas devido à eliminação de rejeitos tóxicos, provenientes de subprodutos gerados pela indústria. A eliminação desses produtos tóxicos é atualmente um dos mais importantes assuntos em controle de poluição, o que tem levado os pesquisadores a buscar novas ferramentas mais poderosas para diminuir ou eliminar a toxicidade dos efluentes gasosos, líquidos e sólidos formados em seus distintos processos, sempre levando em conta as regulamentações e legislações voltadas à proteção ambiental.

O problema da poluição ambiental tem caráter mundial. Originou-se na revolução industrial, intensificou-se com a explosão populacional humana e perpassa pelo método sócio-econômico-cultural do século. Em muitas regiões Brasileiras que abrigam pólos industriais e densa população, o meio ambiente vem sofrendo uma degradação efetiva causada pelos esgotos domésticos e industriais, principalmente o ecossistema aquático. Medidas preventivas e corretivas devem ser implantadas concomitantemente aos crescimentos regionais, conduzindo a população a níveis aceitáveis para a manutenção da qualidade de vida (BALAN, 1999).

A poluição química do ar, solo e água tem se tornado fonte de preocupação. O acúmulo no ambiente de compostos xenobióticos, em consequência das ações humanas nos processos produtivos e de transformação, tornou-se o tema de numerosas pesquisas. Os tratamentos de resíduos e efluentes com microrganismos que aceleram o processo e o rendimento da degradação apontam o potencial das técnicas de bioestimulação e bioremediação que utilizam os microrganismos para degradar compostos perigosos a até substâncias não tóxicas. O poluente funciona como fonte de carbono, sendo geralmente necessário o fornecimento de nitrogênio, fósforo e de um agente oxidante que funcione como receptor de elétrons.

Os problemas causados ao meio ambiente em função dos resíduos decorrentes da industrialização deram origem a diversas tecnologias visando à minimização de impactos ambientais. A observação de como o meio ambiente reage a cada intervenção antropogênica mostra a atuação de microrganismos, existentes em todas as situações, na busca da autopreservação, enfrentando agentes agressores, em alguns casos degradando tais agentes, geralmente contaminantes, constituindo-se numa poderosa arma de defesa ambiental, passível de ser potencializada (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2002).

Do ponto de vista ambiental, a indústria têxtil apresenta grande potencial de poluição, dado ao elevado consumo de corantes durante a etapa de tingimento e ao consumo de aditivos (ligantes, fixadores, antiespumantes, espessantes, amaciantes, resinas, antiestáticos, antichamas e antifungos) durante as etapas de pré-tingimento e armazenagem. Portanto, tal indústria é responsável pela geração de efluentes com elevados níveis de coloração, demanda química de oxigênio (DQO) e sólidos suspensos. Dentre estes, o problema da coloração tem atraído a atenção de pesquisadores, ambientalistas e governos.

A indústria têxtil contribui significativamente para a poluição dos rios em algumas regiões do Brasil ao transformar fibras naturais e sintéticas em tecidos e outros produtos. Em algum ponto do processo de fabricação de tecidos, operações de processamento químico úmido são necessárias para preparar, purificar, colorir ou acabar adequadamente o produto. Isso resulta na geração de efluentes cuja carga de poluentes provém não somente da remoção de impurezas das próprias matérias-primas como também dos reagentes químicos residuais usados no processamento (CAMMAROTA e COELHO, 2001).

Os reagentes utilizados nos processos têxteis apresentam uma composição muito variada, incluindo compostos orgânicos e inorgânicos (BRÁS *et al.*, 2002). Os corantes têxteis, responsáveis pela coloração de águas residuárias, são mistura de compostos com estrutura molecular complexa, o que faz dos mesmos produtos estáveis e de difícil biodegradação (ROSALEN *et al.*, 2004).

Os corantes sintéticos são extensivamente empregados pela indústria têxtil, onde se estima que 10 a 15% são incorporados no efluente após o processo de coloração. A grande diversidade e complexidade desses efluentes, aliados às imposições de legislação que exigem tratamentos eficientes, vêm estimulando o desenvolvimento de novas técnicas que buscam o melhor e o mais adequado tratamento.

Há diversas formas físicas, químicas e biológicas de tratamento para os efluentes têxteis. O sistema biológico de lodo ativado é reconhecido como o mais representativo dentre os utilizados por indústrias têxteis. Em lagoas aeradas, o efluente é submetido à oxidação por microrganismos, reduzindo-se eficientemente a carga poluidora lançada no ambiente.

Os estudos de degradação de compostos químicos têm mostrado vários microrganismos extremamente versáteis em catabolizar moléculas recalcitrantes. Os caminhos atuais da biotecnologia indicam os fungos basidiomicetos, degradadores da

lignina, como eficientes na degradação de uma grande variedade de compostos e corantes, com alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados (BALAN, 1999).

As alternativas mais promissoras para resolução de inúmeros problemas ambientais ocasionados pela atividade industrial derivam do estudo de novas tecnologias para o tratamento de efluentes industriais. Nesse contexto a utilização de processos biológicos baseados na utilização de fungos e bactérias, ou diretamente na utilização de enzimas, tem aparecido como umas das alternativas de grande potencial.

Dentre os processos biotecnológicos de tratamento de efluentes têxteis, com o emprego de enzimas, pode-se citar as enzimas lignolíticas como as lacases, lignina peroxidase e manganês peroxidase, estas enzimas têm demonstrado sua capacidade de descolorir os corantes têxteis, mediante a polimerização ou degradação desses corantes (GÜBITZ, 2003).

A enzima peroxidase é conhecida por sua capacidade de remoção de grupamentos fenólicos e aminas aromáticas de soluções aquosas e também a descoloração de efluentes da indústria têxtil. O tratamento com peroxidase resulta na remoção de grupamentos fenólicos tóxicos dos efluentes industriais, usando peróxido de hidrogênio no processo.

A enzima *Horseradish* peroxidase (HRP) tem sido com sucesso empregada para a decomposição e precipitação de corantes azo. As enzimas peroxidases são encontradas nas plantas (por exemplo, rabanetes) e em animais (plasma sanguíneo, leite, leveduras, etc). As massas molares estão na região de 38-43 kDa, e apresentam-se geralmente na forma de 3 ou 15 isoenzimas.

Uma das motivações pela opção de trabalhar com enzimas para descoloração de corantes e efluentes têxteis é o fato do Estado de Santa Catarina possuir um grande pólo têxtil. A indústria têxtil apresenta um especial destaque, pois requer uma grande quantidade de água e dela resulta um grande volume de efluentes, com alto grau de contaminação e altamente coloridos. Esses corantes se não forem corretamente tratados, podem causar sérios problemas de contaminação ambiental.

Neste trabalho são apresentados os resultados obtidos, através do emprego da enzima *Horseradish* peroxidase (HRP), na descoloração de corantes e efluentes têxteis. Foram determinadas primeiramente as condições ótimas da ação da enzima sobre o corante Turqueza Remazol G 133%, e posteriormente foi feito o emprego em outros

dois corantes e no efluente têxtil. Foi também avaliada a toxicidade dos corantes e do efluente, antes e após o tratamento enzimático.

Esta dissertação está estruturada em seis capítulos. No capítulo 2 é apresentado os objetivos do presente trabalho, no capítulo 3 é apresentada uma revisão bibliográfica sobre indústria têxtil, técnicas de tratamento de efluentes e enzimas. No capítulo 4, é apresentada a metodologia empregada para a obtenção dos dados experimentais. No capítulo 5 são apresentados os resultados das análises e as discussões dos resultados. No capítulo 6 são apresentadas as principais conclusões obtidas neste trabalho, bem como as sugestões para futuros trabalhos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o potencial da enzima *Horseradish* peroxidase (HRP), para descoloração de corantes e efluentes têxteis.

### 2.2 Objetivos específicos:

- Determinar as melhores condições para uma melhor atuação da enzima no corante e no efluente, variando fatores fundamentais, tais como, pH, temperatura, quantidade de  $H_2O_2$ , concentração de corante e concentração de enzima.
- Estudar as diferentes taxas de descoloração dos corantes individualmente, e depois avaliar a descoloração no efluente têxtil, através de espectros UV-Visível.
- Avaliação da toxicidade aguda, dos corantes e do efluente remediado e não remediado, utilizando a *Daphnia magna* e *Artemia salina* e testes de inibição do crescimento da raiz da cebola (*Allium cepa*).



### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Para que se possa avaliar o potencial da aplicação de enzimas para descoloração de corantes e efluentes têxteis, faz-se necessário avaliar as fontes e características dos efluentes têxteis. Um outro item que será analisado neste capítulo é o emprego de enzimas provenientes de diversas origens, e sua potencial aplicação para o tratamento deste resíduo.

#### **3.1. Indústria Têxtil**

A indústria têxtil tem papel de grande importância na maioria dos países, sendo um dos segmentos industriais de maior tradição. Dentre todos os segmentos, ela é responsável por grande parte da economia dos países desenvolvidos, sendo o carro-chefe nos países emergentes .

O complexo têxtil do Estado de Santa Catarina está localizado no Vale do Itajaí, mais especificamente em Blumenau e Brusque, e no norte e noroeste do estado, nos municípios de Joinville e Jaraguá do Sul. As indústrias têxteis respondem hoje por aproximadamente 25% do valor da transformação industrial catarinense.

Em virtude do grande volume de produção, também é significativo o volume de resíduos (sólidos, líquidos e gasosos) que são gerados por essas empresas. As operações de limpeza, tingimento e acabamento são responsáveis pela geração de uma grande quantidade de efluentes que contém uma enorme variedade de produtos químicos, que podem causar uma série de problemas quando estes são descartados sem que os cuidados necessários sejam tomados. O reciclo, mesmo parcial, de insumos e matérias-primas é uma forma bastante significativa de reduzir o problema da poluição ambiental.

A indústria têxtil, especialmente o setor de beneficiamento, é responsável pela poluição, principalmente dos corpos de água, das regiões em que atua. Maiores exigências impostas pela legislação e cobranças sociais vêm criando a necessidade premente de mudar este quadro. Atualmente, as indústrias utilizam sistemas de gestão

ambiental para aumentar a sua produtividade, seja na eficiência das máquinas, na redução dos custos ou agregando alguma característica ao produto final, que possa valorizá-lo no mercado, gerando a menor quantidade de resíduos possíveis .

### 3.1.1 O uso da água na indústria têxtil

Do total de água disponível para consumo mundial, cerca de 88% são utilizadas na agricultura. A indústria é responsável por apenas 7%, ficando os restantes 5% para uso doméstico. Da parte da indústria, o setor têxtil consome por volta de 15% da água, devolvendo-a, depois dos processos, extremamente contaminada (PERES e ABRAHÃO,1998). A água é usada na indústria têxtil, como meio de transporte para os produtos químicos que entram no processo, bem como para remoção do excesso daqueles produtos considerados indesejáveis para o fio ou tecido.

Os problemas ambientais relacionados com a indústria têxtil são numerosos e bem documentados. Além dos problemas associados ao elevado volume de resíduos e à sua elevada carga orgânica, surgem os inconvenientes relacionados com a liberação de corantes não fixados e não-degradados nos processos convencionais de tratamento. A presença desses corantes representa um elevado potencial de impacto ambiental, não apenas em função da toxicidade associada, mas também em relação à interferência em processos fotossintéticos (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2002).

O consumo de água nos processos da indústria têxtil é dependente do tipo de material ou produto final, à medida que este dita a natureza do processo de transformação. Grandes volumes de água são requeridos para o processamento úmido, de modo que a indústria têxtil gera grandes volumes de efluentes contendo quantidades variadas de contaminantes, dentre os quais se destacam os corantes (CAMMAROTA e COELHO, 2001).

A maior parte da carga contaminante é constituída por impurezas inerentes à matéria-prima, produtos adicionados para facilitar os processos de fiação e tecelagem, auxiliares e corantes eliminados durante as diferentes etapas de acabamento. A qualidade e a quantidade de carga contaminada se encontram intimamente relacionadas com as fibras utilizadas para elaborar os tecidos crus (PERES e ABRAHÃO, 1998).

### 3.1.2 Processo Têxtil

Segundo Araújo e Castro (1984), as fibras têxteis são elementos filiformes caracterizados pela flexibilidade, finura e grande comprimento em relação à dimensão transversal máxima, sendo aptas para aplicações têxteis. As fibras têxteis podem ter várias origens, sendo este o critério usado para sua classificação. Assim as fibras podem ser: de origem natural se são produzidas pela natureza sob uma forma que as torna aptas para o processamento têxtil, ou de origem não natural se são produzidas por processos industriais, a partir de polímeros naturais transformados por ação de reagentes químicos, ou por polímeros obtidos por síntese química.

O processo têxtil de produção de tecidos é dividido em fiação, tecelagem e acabamento. Na etapa de fiação a matéria – prima (algodão) é processada nos abridores, batedores, cardas, passadores, penteadeiras, maçaroqueiras, filatórios, retorcedeiras e conicaleiras. Nesta etapa não há geração de efluentes líquidos, pois todas as etapas ocorrem a seco. Na etapa de tecelagem, os fios tingidos ou crus são transformados em tecidos nos teares. Essa etapa trata-se de um processo seco, portanto não ocorre a geração de efluentes líquidos, muito embora a etapa posterior de desengomagem seja uma importante fonte geradora de efluentes líquidos poluidores (BRAILE e CAVALCANTI, 1993).

Os estágios de formação do tecido pouco contribuem para a geração de efluentes líquidos, quando comparados às operações do estágio de processos molhados ou acabamento; essas operações podem ser divididas em:

- Tratamento prévio ou preparação: é um conjunto de operações necessárias para preparar o material têxtil a ser tingido, estampado ou receber um dado acabamento, essas operações são por vezes designadas apenas por alvejamento;
- Tingimento: operação de coloração uniforme do material têxtil;
- Estamparia: Aplicação de um desenho colorido no material têxtil;
- Acabamento propriamente dito: efetuado sobre o tecido alvejado, tingido ou estampado, conforme o caso, de forma a torná-lo mais adequado para sua aplicação.

Muitas dessas operações podem ser efetuadas não só em fibras, em fios, mas também após a confecção. Nas fases de acabamento têxtil são utilizadas, além do substrato têxtil (fios, fibra, tecidos ou confecções), diversas substâncias como a água, resinas, corantes, tensoativos, etc (ABRAHÃO e SILVA, 2002).

### **3.1.3 Beneficiamento Têxtil.**

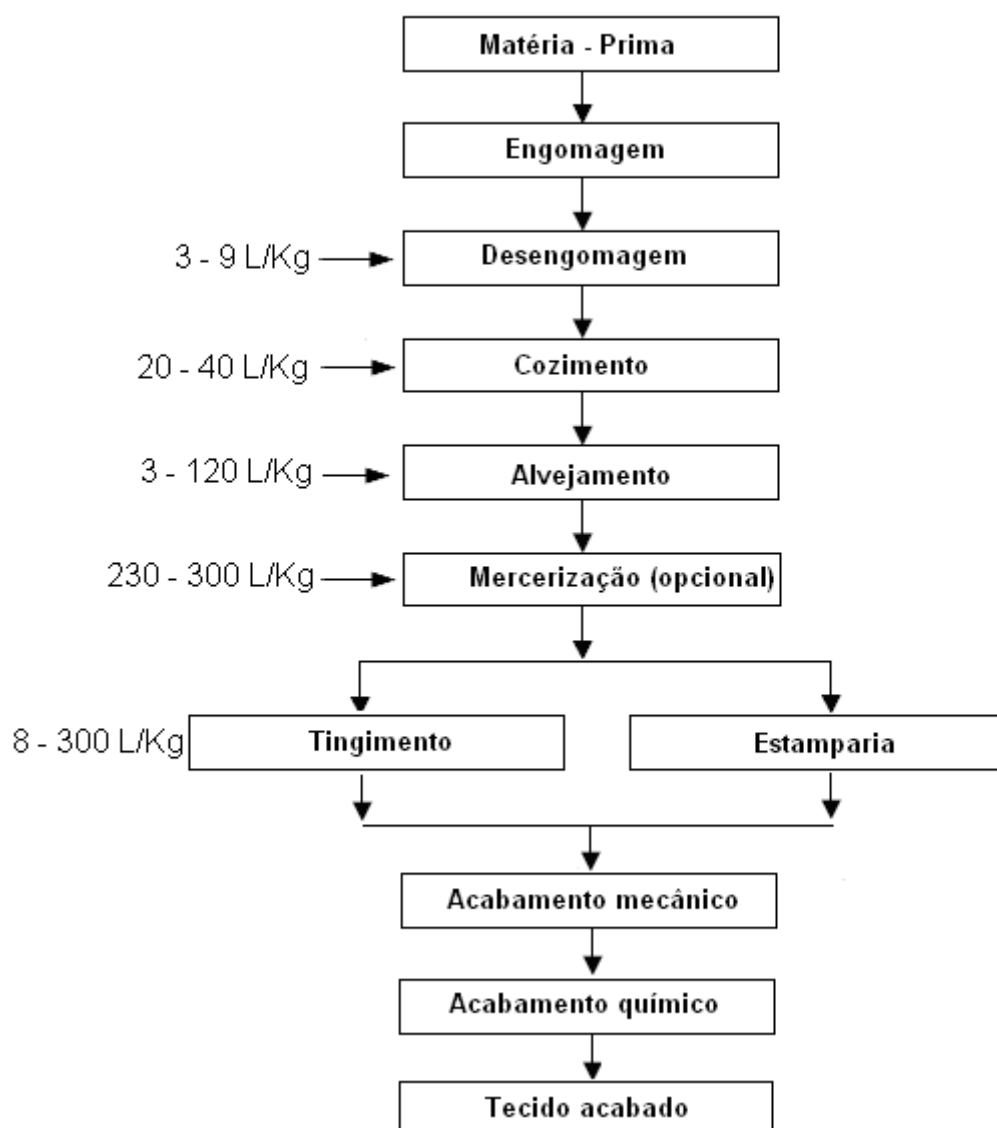
O beneficiamento têxtil consiste em um conjunto de processos aplicados aos materiais têxteis objetivando transformá-los, a partir dos estados crus, em artigos brancos, tingidos, estampados e acabados. A Figura 1 apresenta um fluxograma simplificado das etapas do processo a úmido para os tecidos de algodão e mesclas de algodão de uma indústria têxtil.

#### **3.1.3.1 Matéria – prima têxtil**

Segundo Guaratini e Zanoni (2000), as fibras têxteis podem ser divididas em dois grandes grupos denominados fibras naturais e sintéticas. As fibras naturais mais utilizadas são baseadas em celulose (cadeias poliméricas lineares de glicose) e proteína (polímero complexo composto de diferentes aminoácidos), presentes na lã, seda, algodão e linho. As fibras sintéticas mais utilizadas comercialmente são a viscose, acetato de celulose, poliamida, poliéster e acrílico.

No beneficiamento têxtil, várias etapas produzem efluentes líquidos como a desengomagem, o alvejamento, a lavagem de tecidos, a mercerização, o tingimento, a estamparia e o acabamento de tecidos. Na Figura 1, estão apresentados as principais etapas que consome água na etapa do beneficiamento têxtil.

As composições dos efluentes líquidos em cada processo variam muito em função da diversidade de técnicas, máquinas, matérias-primas, tecidos, etc, empregados nos diferentes processos do beneficiamento têxtil.



**Figura 1 – Etapas características do processamento a úmido de tecidos de algodão e mesclas de algodão (Fonte: EPA, 1997).**

### 3.1.3.2 Engomagem

É um processo que tem como objetivo aumentar a resistência mecânica dos fios crus, que chegam às unidades de engomagem em rolos de urdumes, passando por uma solução de goma a quente e vão formar os urdumes engomados para a tecelagem.

Os fios a serem aplicados no urdume podem ser engomados com amido, alfarroba, goma de carboximetilcelulose, álcool polivinílico, etc. Os fios são engomados

a uma temperatura de aproximadamente 100°C, através de processos contínuos ou por imersão.

### **3.1.3.3 Desengomagem**

A desengomagem é usada para remover a goma aplicada anteriormente para tecelagem. As fibras sintéticas são geralmente engomadas com gomas solúveis em água, que são facilmente removidas por lavagem com água quente, ou no processo de cozimento. As fibras naturais, tais como algodão, são muitas vezes engomadas com gomas ou mistura de gomas e outros materiais. A remoção das gomas antes do cozimento é necessária porque elas podem reagir e causar a mudança de cor quando exposto ao hidróxido de sódio no cozimento (EPA,1997).

Os métodos de desengomagem variam conforme a goma utilizada. Pode ser simplesmente uma lavagem com água quente e detergente, para gomas sintéticas, como pode ser mais complicada, como, por exemplo, uma degradação enzimática para amidos (PERES e ABRAHÃO, 1998). A carga poluidora do efluente da desengomagem resulta de aditivos usados na receita da goma, surfactantes, enzimas, ácidos, álcalis e a própria goma.

### **3.1.3.4 Cozimento (Pré-alveamento)**

É um processo de branqueamento que remove as impurezas das fibras, fios ou tecido através da lavagem. Normalmente são utilizadas soluções alcalinas para o cozimento, porém em alguns casos soluções solventes também podem ser usadas. O procedimento de cozimento específico, adição de produtos químicos, temperatura e tempo de processo variam com o tipo de fibra, fio e estrutura do tecido. As impurezas podem incluir lubrificantes, sujeira e outros materiais naturais, gomas solúveis em água, agentes antiestáticos e tintas residuais usadas para identificação do fio (EPA,1997).

### 3.1.3.5 Alvejamento

O alvejamento remove a coloração amarelada natural das fibras do algodão aumentando a sua brancura. Essa operação é necessária se o tecido acabado for branco ou tinto em cores claras. É um processo de oxidação geralmente utilizado com peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio ou clorito de sódio. Substâncias auxiliares, tais como ácido sulfúrico, ácido clorídrico, soda caustica, bissulfito de sódio e surfactantes, são usados durante o processo e no enxágüe final, contribuindo com a carga poluidora. Os efluentes do alvejamento normalmente possuem um alto conteúdo de sólidos com baixo ou moderado nível de DBO (PERES e ABRAHÃO, 1998).

### 3.1.3.6 Mercerização

A mercerização é um processo químico que tem como objetivo conferir brilho e aumentar a absorção de corantes e a resistência. A mercerização é realizada exclusivamente em tecidos de algodão, que são tratados por um banho de soda cáustica concentrado sob estiramento, seguido por uma lavagem ácida para neutralizar o pH (CORREIA *et al.*, 1994).

### 3.1.3.7 Tingimento

A etapa de tingimento é executada para conferir cor aos fios ou tecidos e para aumentar o valor do produto. Os materiais têxteis são tingidos usando uma ampla gama de corantes, técnicas e equipamentos. Os corantes usados pela indústria têxtil são em grande parte sintéticos, tipicamente derivados do alcatrão e derivados do petróleo (EPA, 1997).

O tingimento pode ocorrer em processos contínuos ou em batelada. No tingimento em batelada, uma certa quantidade de substrato têxtil, geralmente de 100 a 1000 Kg, é carregado em uma máquina de tingimento e o substrato é levado a atingir

um equilíbrio, ou próximo dele com a solução do banho que contém o corante. Os auxiliares químicos e as condições do banho são controladas (principalmente temperatura) para se obter as condições ótimas de tingimento. O corante é fixado na fibra usando calor e produtos químicos. O substrato tingido é lavado para remover os corantes não fixados e os produtos químicos. No processo contínuo, o material têxtil é alimentado continuamente em solução de corante com velocidade geralmente entre 50 e 250 metros por minuto. O processo de tingimento contínuo consiste tipicamente na aplicação do corante, fixação do corante com produtos químicos ou calor, e lavagem. A fixação do corante nas fibras ocorre mais rapidamente em tingimento contínuo que em batelada (EPA, 1997).

A adsorção e retenção do corante na fibra pode ser química, física ou ambas, dependendo da fibra e do corante. O grau de adsorção é função de vários fatores, tais como temperatura, pH, auxiliares químicos e tempo (PERES e ABRAHÃO, 1998).

#### **3.1.3.8 Estamparia**

Os tecidos são muitas vezes estampados com cores e estampas usando uma variedade de técnicas e tipos de equipamentos. O processo de estamparia pode ser o toque final para os produtos já confeccionados, que receberão estampas por quadros, ou seja, a estampagem é feita em algum ponto de sua extensão física. E para os tecidos, que receberão estampas em toda sua extensão, são usados rolos gravados que alcançam toda a peça. Das numerosas técnicas de estampar, a mais comum é a tela rotativa (rolos). São usados pigmentos em cerca de 75 a 85% do total das operações de estampagem e não são necessárias etapas de lavagem. Comparados com os corantes, os pigmentos são tipicamente insolúveis e não tem afinidade pelas fibras. Resinas ligantes são usadas para aderir os pigmentos aos substratos. Solventes são usados como veículos para transportar a mistura pigmento e resina para o material têxtil. Após a evaporação dos solventes permanece a camada de resina e pigmento fixa (EPA,1997).



### 3.1.3.9 Acabamento

O acabamento é realizado por tratamento mecânico ou químico para melhorar no tecido algumas propriedades como aparência, brilho, toque, caimento, resistência, estabilidade, repelência à sujeira, à água e ao fogo. O acabamento mecânico pode envolver cardação, calandragem ou outros tratamentos físicos usados para aumentar o brilho e toque aos têxteis. O acabamento químico pode conferir aos têxteis uma variedade de propriedades, desde diminuição da eletricidade estática ao aumento de resistência à chama (ARAÚJO e CASTRO, 1984).

### 3.1.4 Produtos Químicos Auxiliares Utilizados na Indústria Têxtil.

Os produtos químicos auxiliares utilizados na indústria têxtil são substâncias constituídas por uma parte hidrofílica (polar) e uma parte hidrofóbica (apolar) que tem a propriedade de reduzir a tensão superficial dos líquidos. Conforme são combinados os diferentes tensoativos obtém-se uma determinada ação e, conseqüentemente, uma diferente aplicação. A formulação normalmente se baseia em uma base (tensoativa ou não) e demais tensoativos auxiliares.

Steinhart (2000), define a ação dos tensoativos nas diferentes aplicações têxteis, tais como:

- **“Carriers”**: Possuem, como base de formulação, substâncias não tensoativas, porém contém tensoativos em sua formulação. A substância ativa tem afinidade pela fibra, mas não é solúvel em água. Por isso são necessários tensoativos a fim de se emulsionar o princípio ativo em ação.

- **Igualizantes**: São produtos específicos para determinadas fibras ou corantes. Na escolha do igualizante, é relevante determinar o tipo de fibra a ser tingida e o tipo de corante escolhido. Existem três tipos de ação dos igualizantes: ter afinidade com a fibra, ter afinidade com o corante e, não ter afinidade com o corante ou fibra, tendo sua ação exclusivamente na alteração da tensão superficial.

- **Retardantes**: São igualizantes constituídos por tensoativos catiônicos.

- **Dispersantes:** Ou colóide protetor, tem como função principal impedir reaglomeração dos sólidos, ou seja, manter a melhor dispersão.

- **Umectantes:** Esses tensoativos têm como função principal emulgar o ar presente no tecido em água, mais especificamente substituir as superfícies de contato ar/tecido por uma superfície de contato água/tecido.

- **Detergentes:** São tensoativos que possuem a propriedade de umectar os substratos têxteis, permitindo que, pela quebra da tensão superficial da água, a sujeira seja facilmente removida do material para a fase líquida. Mantêm em suspensão as partículas removidas, não permitindo que se reaglomerem e se depositem na superfície do substrato. Têm a propriedade de emulsionar as gorduras ou óleos presentes nos substratos têxteis.

- **Antiespumantes:** Agem na estrutura da espuma fazendo com que a mesma perca elasticidade e se rompa.

- **Amaciantes:** conferem a sensação de maciez e volume, que é dada pela parte hidrófoba da base amaciante. Por esse motivo, a absorção de água dos materiais têxteis fica prejudicada quando da aplicação de um amaciante.

Na Tabela1 são apresentados os produtos químicos auxiliares mais utilizados no processo de tingimento.

**Tabela 1: Auxiliares químicos utilizados em tingimento.**

Descrição	Composição	Função
Sais	Cloreto de sódio Sulfato de sódio	Retardante
Ácidos	Acético e sulfúrico	Controle de pH
Bases	Hidróxido de sódio Carbonato de sódio	Controle de pH
Seqüestranes	EDTA	Seqüestranes
Dispersantes e Surfactantes	Aniônicos, catiônicos e não – iônicos	Amaciante, dispersante de corantes
Agentes Oxidantes	Peróxido de hidrogênio Nítrito de sódio	Insolubilizante de corante
Agentes Redutores	Hidrossulfito de sódio Sulfeto de sódio	Remoção de Corantes não reagidos
“Carriers”	Organoclorados	Solubilizante Aumenta a Adsorção

Fonte: PERES e ABRAHÃO, 1998.

Segundo Steinhart (2000), os tensoativos ainda podem ser considerados como auxiliares no sistema de tratamento biológico de efluentes pois, quando em baixas concentrações, como é o caso da indústria têxtil, auxiliam na decomposição de substâncias insolúveis em água. Isso se deve ao fato de solubilizarem o material (solubilizam as substâncias de baixa solubilidade em água) facilitando o acesso das bactérias às substâncias a serem degradadas.

### 3.1.5 Corantes Têxteis

Os corantes são substâncias intensamente empregadas para a coloração de vários substratos, tais como: alimentos, cosméticos, plásticos, substratos têxteis, etc. São retidos por adsorção física, formação de soluções, sais ou complexos com metais, retenção mecânica ou por constituição de pontes químicas covalentes (ROSALEN, 2004).

A importância dos corantes para a civilização humana é evidente e bem documentada. Aproximadamente 10.000 diferentes corantes e pigmentos são usados

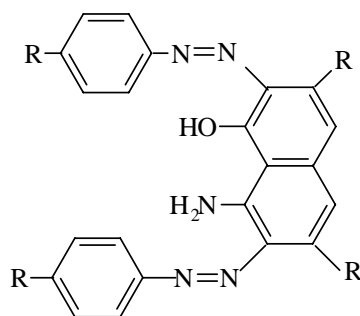
industrialmente, representando um consumo anual de cerca de  $7 \times 10^5$  tons no mundo, sendo 26.500 tons somente no Brasil (SPADARO *et al.* 1992; NIGAM *et al.* 1996; KUNZ *et al.* 2002).

O tingimento de tecidos é uma arte que começou há milhares de anos e a disponibilidade comercial de corantes é enorme. A tecnologia moderna utilizada no tingimento consiste de dúzias de etapas que são escolhidas de acordo com a natureza da fibra têxtil, características estruturais, classificação e disponibilidade do corante para aplicação, propriedades de fixação compatíveis com o destino do material a ser tingido, considerações econômicas, etc (GUARATINI e ZANONI, 2000).

O processo de tingimento é um dos fatores fundamentais no sucesso comercial dos produtos têxteis. Além da padronagem e beleza da cor, o consumidor normalmente exige algumas características básicas do produto, tais como elevado grau de fixação em relação à luz, lavagem e transpiração, tanto inicialmente quanto após o uso prolongado. Para garantir essas propriedades, as substâncias que conferem coloração à fibra devem apresentar alta afinidade, uniformidade na coloração, resistência a agentes desencadeadores do desbotamento e ainda apresentar-se viável economicamente.

Corantes compreendem dois componentes principais: o grupo cromóforo, responsável pela cor que absorve a luz solar, e o grupo funcional que permite a fixação nas fibras do tecido (DURÁN *et al.*, 2000b).

Existem vários grupos cromóforos utilizados atualmente nos corantes mais, sem dúvida, os mais representativos e largamente utilizados são os da família dos azo corantes. Os azo corantes (Figura 2) representa atualmente cerca de 60% do mercado mundial de corantes, sendo amplamente utilizados no tingimento da fibra têxtil (VANDEVIVERE *et al.*, 1998).



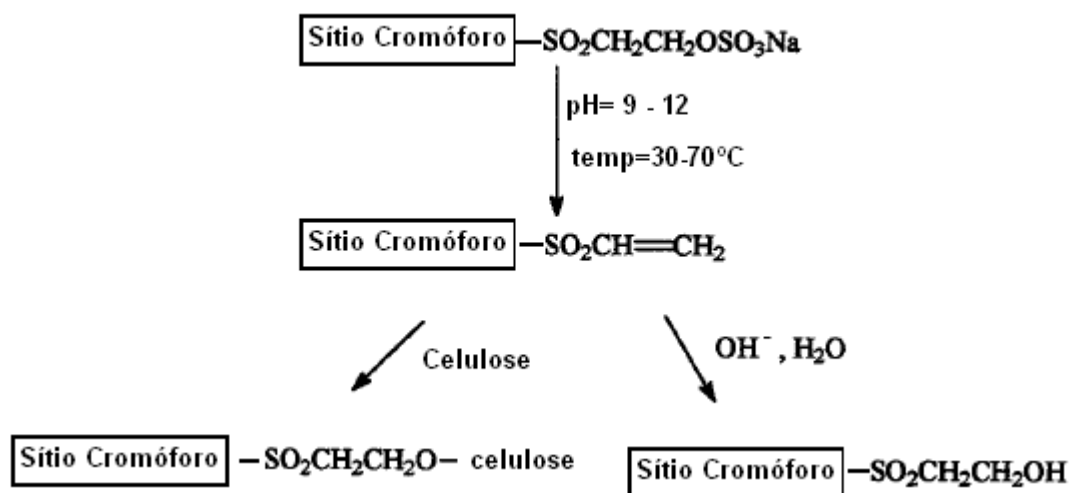
**Figura 2 : Estrutura química de um azo corante.**

Fonte: KUNZ *et al.*, 2002.

Os corantes têxteis, principalmente os azo corantes, representam um problema ambiental emergente. Uma grande quantidade de resíduos de corantes é descartada nos efluentes durante o processo de tingimento na indústria têxtil. O problema surge não só devido à cor no efluente, como também devido aos resíduos dos azo corantes que podem passar a prejudicar potencialmente a jusante de um rio ou manancial.

Segundo Guaratini e Zanoni (2000), no processo de tingimento têxtil, utilizam-se vários corantes que são classificados de acordo com sua estrutura química (antraquinona, azo e etc) ou de acordo com o método pelo qual ele é fixado na fibra têxtil. Os corantes são classificados como corantes: reativos, diretos ou substantivos, azóicos, ácidos, a cuba, de enxofre, dispersos, pré-metalizados ou branqueadores.

**3.1.5.1 Corantes Reativos:** Os corantes deste grupo possuem como característica a alta solubilidade em água e o estabelecimento de uma ligação covalente entre o corante e a fibra, cuja ligação confere maior estabilidade na cor do tecido tingido quando comparada a outros tipos de corantes em que o processo de coloração se opera através de ligações de menor intensidade. A montagem se efetua pela adição de um eletrólito. A interação do corante com a fibra é ilustrada na Figura 3.



**Figura 3: Interação de corantes reativos do tipo vinil sulfonato com a fibra têxtil .**

Fonte: KUNZ, 2002.

**3.1.5.2 Corantes diretos ou substantivos:** São corantes solúveis em água. Tingem diretamente as fibras de celulose (algodão, viscose, etc), através das interações de van der Waals. O banho aquoso deve ser acrescido de um eletrólito para aumentar a afinidade pela fibra. A grande vantagem desta classe de corantes é o alto grau de exaustão durante a aplicação e conseqüente diminuição do conteúdo de corante nas águas de rejeito.

**3.1.5.3 Corantes Azóicos:** São compostos coloridos insolúveis em água, que são realmente sintetizados sobre a fibra durante o processo de tingimento. Nesse processo a fibra é impregnada com um composto solúvel em água, conhecido como agente de acoplamento, que apresenta alta afinidade por celulose. A adição de um sal de diazônio provoca uma reação com o agente de acoplamento já fixado na fibra e produz um corante insolúvel em água. O fato de usar um sistema de produção do corante diretamente sobre a fibra, através da combinação de um corante precursor sem grupos sulfônicos e a formação de um composto solúvel, permite um método de tingimento de fibras celulósicas com alto padrão de fixação e alta resistência contra luz e umidade.

**3.1.5.4 Corantes ácidos:** O termo ácido corresponde a um grupo de corantes aniônicos, portadores de um a três grupos sulfônicos. São solúveis em água, têm aplicação em

fibras protéicas e em fibras de poliamida sintética. Esses corantes caracterizam-se por substâncias com estrutura química baseada em composto azo, antraquinona, triarilmetano, azina, xanteno, ketonimina, nitro e nitroso, que fornecem uma ampla faixa de coloração e grau de fixação.

**3.1.5.5 Corantes a cuba:** São também chamados de corantes tina e de redução e são insolúveis em água. Através de redução com hidrossulfito de sódio em meio alcalino, transformam-se em leuco derivados solúveis e tingem as matérias têxteis celulósicas. A maior aplicação deste tipo de corante tem sido o tingimento de algodão embora, devido às excelentes propriedades de fixação, para que outros materiais também sejam utilizados. Como a produção química de hidrossulfito de sódio pode causar problemas ecológicos, o custo operacional dessa classe de corante tem sido bastante alto.

**3.1.5.6 Corantes de Enxofre:** É uma classe de corantes que após aplicação se caracteriza por compostos macromoleculares com pontes de polissulfetos, os quais são altamente insolúveis em água. Em princípio são aplicados após pré-redução em banho de ditionito de sódio, que lhes confere a forma solúvel; são reoxidados subsequente sobre a fibra pelo contato com ar. Este composto tem sido utilizado principalmente no tingimento de fibras celulósicas, conferindo cores pretas, verde oliva, azul marinho, marrom, apresentando boa fixação. Entretanto, estes corantes usualmente apresentam resíduos tóxicos.

**3.1.5.7 Corantes Dispersos:** Constituem uma classe de corantes insolúveis em água aplicados em fibras de celulose e em outras fibras hidrofóbicas através de suspensão. Durante o processo de tingimento, o corante sofre hidrólise e a forma originalmente insolúvel é lentamente precipitada na forma dispersa sobre o substrato têxtil. Para sua aplicação são necessários agentes dispersantes. Esta classe de corantes tem sido utilizada principalmente para o tingimento de fibras sintéticas, tais como: acetato de celulose, nylon, poliéster, poliacrilonitrila.

**3.1.5.8 Corantes Pré-Metalizados:** São úteis principalmente para o tingimento de fibras protéicas e poliamida. São caracterizados pela presença de um grupo hidroxila na posição orto em relação ao cromóforo azo, permitindo a formação de complexos com íons metálicos. Nesse tipo de tingimento explora-se a capacidade de interação entre o metal e os grupamentos funcionais portadores de pares de elétrons livres, como aqueles presentes nas fibras protéicas. A desvantagem ecológica deste tipo de corante está associada ao alto conteúdo de metal presente nas águas de rejeito.

**3.1.5.9 Corantes Branqueadores:** As fibras têxteis no estado bruto, por serem compostas primariamente de materiais orgânicos, apresentam como característica uma aparência amarelada por absorver a luz principalmente na faixa de baixo comprimento de onda. A diminuição dessa tonalidade tem sido efetuada na indústria ou lavanderia pela oxidação da fibra com alvejantes químicos ou utilizando-se os corantes brancos também chamados branqueadores ópticos ou mesmo branqueadores fluorescentes.

## 3.2 Geração e Tratamento de Efluentes Têxteis

Nas ultimas décadas, os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais críticos e freqüentes, principalmente devido ao desmedido crescimento populacional e ao aumento da atividade industrial. Os problemas devido à ação antrópica têm atingido dimensões catastróficas, podendo ser observados através de alterações na qualidade do solo, ar e água. A contaminação de águas naturais tem sido um dos grandes problemas da sociedade moderna (KUNZ *et al.*, 2002).

Um problema crescente para a indústria têxtil é a exigência da legislação governamental com relação à remoção da cor nos efluentes industriais. As exigências de proteção ambiental de todo o mundo vem promovendo a prevenção da transferência de problemas de poluição de um ambiente para outro. Isso implica que a indústria deve desenvolver tratamento de seus efluentes “*in loco*” antes de despejá-los. Para o atendimento de tais exigências, tanto as indústrias como os cientistas têm direcionado suas pesquisas na busca de tratamentos e tecnologias visando à descoloração de corantes nos efluentes (BANAT *et al.* 1996).



As indústrias têxteis causam um considerável impacto na qualidade da água, dado o grande volume de efluentes gerados e suas propriedades físico-químicas. Esse impacto é devido a uma ação combinada de uma alta demanda química de oxigênio (DQO), sólidos em suspensão, substâncias dissolvidas, pH, cor e toxicidade (ABRAHÃO e SILVA, 2002).

As composições dos efluentes líquidos em cada processo variam muito em função da diversidade de técnicas, máquinas, matérias primas, tecidos, etc. Na Tabela 2 são mostrados os valores mais prováveis de alguns efluentes líquidos têxteis, dados esses que dependem também do corante utilizado, da fibra e do método de tingimento (ABRAHÃO e SILVA, 2002).

Segundo Guaratini e Zanoni (2000), devido a sua própria natureza, os corantes são facilmente detectáveis a olho nu, sendo visíveis em alguns casos mesmo em concentrações tão baixas quanto 1ppm (1mg/L). Este comportamento apresenta vantagens e desvantagens, pois uma pequena quantidade lançada de efluentes no ambiente aquático pode causar acentuada mudança de coloração dos rios, mas pode também ser detectada pelo público e autoridades que controlam os assuntos ambientais.

**Tabela 2: Valores mais prováveis de alguns efluentes líquidos têxteis.**

<b>Fibra</b>	<b>Processo</b>	<b>pH</b>	<b>DBO(mg/L)</b>	<b>ST(mg/L)</b>	<b>Água (L/Kg)</b>
	Desengomagem	6-8	1700-5200	16000-32000	3-9
Algodão	Purga	10-13	50-2900	7600-17400	26-43
	Alvejamento	8-10	90-1700	2300-14400	3-124
	Mercerização	5-9	45-65	600-1900	232-308
	Tingimento	5-10	11-1800	500-14000	8-300
Poliamida	Purga	9-11	1000-1500	1500-2000	50-70
Poliéster	Tingimento	6-9	300-400	500-700	15-30
	Purga	-	500-800	-	25-40
	Tingimento	-	500-27000	-	15-30
Viscose	Purga Final	-	600-750	-	15-30
	Purga	6-9	2500-3500	3000-3500	15-30
	Tingimento	6-9	2500-3500	3000-3500	15-30

Fonte: ABRAHÃO e SILVA (2002)

O desenvolvimento de tecnologia adequada para tratamento de efluentes tem sido objeto de grande interesse nos últimos tempos devido ao aumento da rigidez da Legislação ambiental. As principais técnicas disponíveis na literatura para descoloração das águas de rejeito envolvem principalmente processos de adsorção, precipitação, degradação química, eletroquímica e fotoquímica, biodegradação, entre outros.

O tratamento de efluentes têxteis tem sido considerado uma das mais importantes categorias de controle da poluição da água, devido à alta intensidade de cor e grandes concentrações de contaminantes orgânicos (LEE *et al.*, 1999). São caracterizados pelo grande volume e extrema variação na composição, podendo incluir corantes não biodegradáveis e substâncias tóxicas. O tratamento dos despejos industriais das fábricas de tecido pode ser auxiliado por práticas como:

- a) A redução de despejos no processamento (reduzindo volume de água e produtos);
- b) A realização de modificações no processo e boa manutenção;

c) O lançamento de despejos na rede pública de esgotos, para serem tratados nas estações municipais;

d) O tratamento dos despejos na própria área industrial, que deverá ser cuidadosamente planejado, devido às variações súbitas de vazão e de produtos químicos empregados no processo. As soluções pouco concentradas poderão ser reutilizadas nas unidades de lavagem de tecidos com grande quantidade de sujeira, ou recirculadas antes do descarte (BALAN, 1999).

Embora a maioria dos efluentes têxteis seja tratada em sistemas de lodos ativados, grande parte dos corantes sintéticos é recalcitrante à biodegradação, criando um problema antiestético nas águas que o recebem devido à coloração remanescente.

Os efluentes têxteis são considerados de alto poder tóxico para a biota aquática, além de causarem eutrofização das águas, alterações na DBO e no oxigênio dissolvido, redução da fotossíntese, devido à diminuição de entrada de luz na água, diferentes graus de toxicidade, mutagênese e carcinogênese. Quando esses efluentes sofrem reações químicas com outros compostos no meio, seja por carvão ativado, ou por tratamentos químicos, ocorre a formação de aminas aromáticas, as quais podem ser mais tóxicas do que o próprio corante inicial, contido no efluente (RODRIGUES, 2003).

Os métodos para remoção de DQO (Demanda Química de Oxigênio), da maioria dos efluentes, estão bem estabelecidos. Já os corantes são mais difíceis de tratar devido a sua origem sintética e principalmente pela estrutura aromática complexa.

Os corantes são tão variados em suas estruturas que nenhum esquema simples pode ser desenvolvido para sua remoção de águas residuárias. Alguns poderão sofrer biodegradação e os metabólitos formados poderão ser ainda mais tóxicos do que aqueles que lhe deram origem. Se um tratamento tem que ser considerado, então este tratamento pode incluir processos físicos, químicos, físico-químicos ou biológicos (RODRIGUES, 2003).

Um dos maiores problemas em águas residuárias é a recalcitrância de certas substâncias. O processo de tratamento pode ser dividido em quatro grupos: processos de separação (concentração de orgânicos sem alteração química), processos de degradação (processos oxidativos que tem a intenção de mineralizar os orgânicos para a forma de CO<sub>2</sub> e água), processos que modificam quimicamente os constituintes do efluente, mas não levam a mineralização (processos de redução, como por exemplo, a desalogenação), e a preparação do efluente pela adição de certos compostos químicos para tratamento

subseqüente por degradação ou separação, quebra de emulsões, floculação, precipitação ou ajuste de pH (RODRIGUES, 2003).

Em recentes revisões sobre tecnologias emergentes para o tratamento de resíduos industriais, encontra-se descrita a grande parte das tecnologias avançadas para tratamento de efluentes têxteis (VANDEVIVERE *et al*, 1998). Alguns processos, como o de ozonização, apresentam custo muito elevado. Outros processos, como a eletrólise, permitem uma eficiência maior que os sistemas convencionais, com um baixo custo operacional. A fotocatalise com  $\text{TiO}_2$  mostrou-se promissora, mas devido à limitada penetração da luz UV na solução de corante, os autores sugerem utilizar um pré-tratamento com ozônio. Neste caso, a cor foi completamente removida e o carbono orgânico total (COT) foi reduzido em 90%.

A Figura 4 apresenta um organograma das classes de tratamento de efluentes industriais.



**Figura 4: Organograma das classes de tratamento de efluentes (POA=Processos Oxidativos Avançados).**

As técnicas de tratamento fundamentadas em processos de coagulação, seguidos de separação por flotação ou sedimentação, apresentam uma elevada eficiência na remoção de material particulado. No entanto, a remoção de cor e compostos orgânicos dissolvidos mostra-se deficientes. Os processos de adsorção em carvão ativado apresentam uma eficiência significativamente maior, contudo em função da superfície química do carvão ser positiva, a adsorção de corantes de caráter catiônico é uma limitação bastante importante (KUNZ *et al.*, 2002).

Banat *et al.* (1996) citam numerosas técnicas físicas e químicas que incluem floculação físico-química combinada com flotação, eletroflotação, floculação com

$\text{Fe(II)Ca(OH)}_2$ , filtração por membrana, coagulação eletrocinética, destruição química, troca iônica, irradiação, precipitação, ozonização, adsorção e o método de tratamento Katox (comercial), envolvendo o uso de carbono ativado e misturas de ar. O tratamento de águas residuárias coloridas e sua descoloração parece ainda ser uma tarefa difícil.

Outras reações como hidrólise, fotólise, ionização, vaporização e adsorção físico-química, podem ocorrer no meio ambiente, levando à degradação de compostos. Por exemplo, o uso de métodos de degradação baseados em reações fotoquímicas tem se mostrado importante como etapa primária na degradação de alguns corantes, segundo Guaratini e Zanoni (2000), uma vez que os corantes sintéticos apresentam a princípio alta estabilidade quando submetidos à luz visível ou ultravioleta.

Segundo Banat *et al.* (1996), nenhum processo aplicado de forma individual parece ser capaz de efetivamente descolorir os resíduos aquosos das indústrias têxteis e geralmente preconiza-se a aplicação de métodos combinados.

Para o tratamento de efluentes têxteis, a combinação de métodos mostra-se mais adequada, devido à presença de corantes que normalmente são resistentes à degradação nos sistemas convencionais de tratamento. Em geral tem sido dado uma maior ênfase aos métodos que combinam os processos biológicos com alternativas físicas ou físico-químicas, tais como floculação, adsorção ou oxidação química (KUNZ *et al.*, 2002).

Dentre os processos físicos mais utilizados no tratamento de efluentes e corantes têxteis, a adsorção com carvão ativado vem sendo intensamente estudada. O estudo de alguns agentes alternativos utilizando-se de biomassa como adsorvente também tem despertado atenção. Alguns trabalhos foram publicados nos últimos anos utilizando carvão ativado de coco, casca de eucalipto e quitosana como materiais adsorventes (KUNZ *et al.*, 2002).

A principal desvantagem da adsorção com carvão ativado granular é sua forma lenta de adsorção. Algumas vezes é necessário pré-tratar antes da adsorção já que concentrações de sólidos suspensos maiores que 50 mg/L podem se acumular nos leitos de carvão e reduzir a eficiência da descoloração. A adsorção sobre o carvão ativado granular é aplicável em processos descontínuos e com baixas concentrações de cor (BRAILE e CAVALCANTI, 1993).

Richardson (1983), citado por Rodrigues (2003), destaca a ozonização como um método de transformação química. De qualquer forma, grandes quantidades de ozônio são necessárias para uma degradação extensiva dos corantes. Os produtos da oxidação são então removidos por floculação, ou sujeitos a processos de tratamento microbiano. A oxidação por ozônio é capaz de degradar hidrocarbonetos clorados, fenóis, pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos. Este método mostra melhores resultados na oxidação de moléculas menores, resultando na redução da coloração. Essas pequenas moléculas podem ter propriedades tóxicas, e assim a ozonização usada em conjunto com um processo físico pode resolver o problema.

Nos tratamentos com cloro, dióxido de cloro ou cloramina, os quais embora mesmo sendo de menor custo, não são satisfatórios devido à formação de resíduos, a descoloração de corantes azóicos com redução pode ser reversível e geralmente não envolve a degradação real da molécula de corante.

Dentre os processos que são eficientes para descoloração de águas da indústria têxtil incluem ultrafiltração, adsorção em carvão ativado, ou precipitação com cal. Os processos de lodo ativado ou lagoas aeradas são ineficientes para a descoloração, embora eles consigam a redução da demanda química de oxigênio. Essa ineficiência para descoloração é provavelmente devido ao baixo conteúdo de nutrientes (nitrogênio e fósforo) nestas águas, e à toxicidade causada pela presença de compostos fenólicos (RICHARDSON, 1983, citado por RODRIGUES, 2003).

Os processos com membranas incluem várias técnicas, nas quais a pressão é utilizada para passar o efluente sobre uma membrana semipermeável. Essa membrana permite que a água atravesse, mas impede a passagem das substâncias solúveis que estão contidas no efluente. Variando as membranas, pode-se eliminar da água substâncias de distintos pesos moleculares (SANIN, 1997).

Atualmente muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos utilizando as técnicas com membranas para o tratamento dos efluentes gerados pela indústria têxtil, que tem por objetivo clarificar, concentrar e o mais importante separar o corante do efluente. Este método de filtração é adequado para a recirculação da água dentro de uma planta industrial se o efluente contém baixas concentrações de corantes, mas é incapaz de reduzir a quantidade de sólido dissolvido, o que faz a reutilização da água uma tarefa difícil (NIGAM *et al.*, 2001).

Uma das direções ainda a ser exploradas é o uso de microorganismos termotolerantes ou termofílicos nos sistemas de descoloração, devido às altas temperaturas dos processos têxteis (BANAT *et al.*, 1996).

### 3.3 Tratamento de Corantes e Efluentes Têxteis por Processos Biológicos

Tratamentos de efluentes utilizando processos biológicos são freqüentemente utilizados. Nesses processos ocorre a transformação de compostos orgânicos tóxicos em compostos mais simples como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e/ ou CH<sub>4</sub>, com custos relativamente baixos. Este tipo de tratamento fundamenta-se na utilização dos compostos presentes no efluente, como substrato para crescimento e manutenção do microrganismo.

Os processos biológicos podem ser divididos em aeróbios e anaeróbios. Nos processos aeróbios, o receptor de elétrons é o oxigênio molecular e os principais produtos finais são CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Nos processos anaeróbios, que degradam os compostos orgânicos tóxicos principalmente a CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, o oxigênio está ausente, sendo que algumas formas de carbono, enxofre e nitrogênio participam como receptores de elétrons.

A aplicação deste processo está na remoção da matéria orgânica presente nos efluentes industriais, usualmente medida pela demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) e carbono orgânico total (COT).

O acentuado desenvolvimento da biotecnologia tem propiciado muitas alternativas que viabilizam o tratamento biológico de efluentes industriais. Trabalhos recentes destacam que diferentes efluentes são tratados por esses processos. Vários são os processos biológicos que vem sendo estudados para o tratamento dos resíduos da indústria têxtil visando à descoloração destes. Ao longo dos anos inúmeras culturas microbianas têm sido testadas e muitas vêm sendo aplicadas na descoloração de corantes têxteis (BANAT *et al.*, 1996).

A grande motivação dos pesquisadores envolvidos em estudos de biodegradação pode ser expressa pela busca contínua de microrganismos versáteis, capazes de degradar de maneira eficiente um grande número de poluentes a um baixo custo operacional. Na prática, sabe-se que isto é muito difícil principalmente em função

da diversidade, concentração e composição de espécies químicas presentes em cada efluente (KUNZ *et al.*, 2002).

A aplicação de microrganismos, para a biodegradação de corantes sintéticos, é um atraente método de simples operação. Porém os mecanismos biológicos podem ser complexos. Um grande número de espécies foi testado por Forgacs *et al.* (2004), para descoloração e mineralização de vários corantes. Infelizmente a maioria destes compostos são quimicamente estáveis e resistentes ao ataque microbiológico. O isolamento de novas culturas, e a adaptação das existentes para a decomposição de corantes, provavelmente aumentará a eficácia de biorremediação de corantes em um futuro próximo.

Chen *et al.* (2003) estudaram a descoloração de corantes têxteis por bactérias isoladas. A eficiência do processo, depende da adaptação do microrganismo selecionado. Com o passar do tempo, surgiram muitos estudos com microrganismos capazes de degradar azo corantes, incluindo bactérias, fungos, actinomicetos e algas.

Segundo Banat *et al.* (1996), dentre os microrganismos relacionados com a descoloração dos corantes têxteis estão as bactérias, fungos, algas e mais recentemente os consórcios de bactérias. Muitas bactérias foram capazes de descolorir os corantes têxteis. Os problemas encontrados relacionam-se ao isolamento desses microrganismos, ao período de adaptação desses ao meio contendo o poluente e a capacidade de descolorir vários corantes.

Através de processos microbiológicos combinados, anaeróbio e aeróbio usando populações de microrganismos adaptadas e misturadas, acredita-se aumentar ainda mais a degradação de corantes têxteis (ABADULLA *et al.*, 2000a). Diversas tecnologias foram sucessivamente desenvolvidas, para o tratamento anaeróbio/aeróbio de corantes de águas residuárias. Foi observado que a remoção de corantes de água residuária, em um sistema anaeróbio/aeróbio, ambos os processos envolveram a decomposição por bactéria e adsorção no lodo (FORGACS *et al.*, 2004).

A eficácia de várias aplicações do tratamento anaeróbio para a degradação de uma ampla variedade de corantes sintéticos tem sido muitas vezes demonstrada (DELEE *et al.*, 1998, citado por FORGACS *et al.*, 2004). A descoloração de corantes reativos solúveis em água é realizada sob condições anaeróbias quando se usa glicose como fonte de carbono. Suplemento, como amido de mandioca, também melhorou a eficácia de



remoção da cor de água residuária sintética azul (CHINKEWITVANICH *et al.*, 2000, citado por FORGACS *et al.*, 2004).

Walker e Wetherley (2000), analisando o emprego de bactérias aeróbias, tais como *Bacillus gordonae*, *Bacillus benzeovorans* e *Pseudomonas putida*, obtiveram bons resultados na descoloração do corante ácido antraquinona Tectilon Blue, utilizado no tingimento de carpetes. A descoloração foi de 19% causada por biosorção. Porém os cálculos mostraram que os *Bacillus*, além de promoverem a biosorção, também degradam o corante mais rápido do que a bactéria *Pseudomonas*.

Conforme estudado por Banat *et al.* (1996) o emprego de consórcios de bactérias para descolorir corantes têxteis, essa condição pode ser melhorada uma vez que os resíduos contém mais de um corante, além de outros produtos químicos, no entanto, nessa situação as condições do meio devem, frequentemente, ser alternadas por condições de anaerobiose e/ou aerobiose para alcançar-se completa degradação. Recentemente, uma mistura de bactérias, chamadas de PDW e PDC mostraram-se capazes alguns dos vários corantes têxteis testados (BANAT *et al.* 1996).

Nigam *et al.* (1996) fizeram experimentos de descoloração de compostos azo com processos microbianos e verificaram crescimento rápido da cultura PDW de bactérias e descoloração eficiente sob condições anaeróbias (100% da descoloração de 5 entre 9 compostos de corantes testados dentro de 48 horas). Este tratamento é simples, rápido e econômico para a descoloração de corantes e pode ter aplicações potenciais no tratamento de efluentes da indústria têxtil.

Chen *et al.* (2003) isolaram 6 linhagens de bactérias de amostras de lodo capazes de degradar corantes têxteis, sendo identificada e selecionada *Aeromonas hydrophila*, que exibiu a capacidade de remoção de cor de vários corantes. A remoção de cor por esta bactéria ocorreu melhor em condições anóxicas ou anaeróbias. Mais de 90% do corante RED RBN foi biodegradado com oito dias de incubação na concentração de 3000mg/L. Fontes de nitrogênio adicionadas ao meio como extrato de levedura e peptona aumentaram a eficiência de descoloração, em contraste; a presença de glicose parece inibir a atividade de descoloração, porque ácidos orgânicos são produzidos através da sua conversão provocando a diminuição do pH do meio de cultura, inibindo assim, o crescimento celular e, consequentemente, a atividade de descoloração.

Beydilli *et al.* (1998) fizeram um estudo utilizando azo corantes reativos, preto-5, vermelho-2, vermelho-120, amarelo-3, amarelo-15 e amarelo-17, usando uma cultura anaeróbia, sob condições metanogênicas enriquecidas de lodo de esgoto municipal; alguns ensaios foram realizados para avaliar o potencial de toxicidade dos corantes selecionados aos microrganismos anaeróbios, bem como, para determinar a biodegradabilidade anaeróbia destes corantes. A produção total de gás e de metano foram monitoradas. Não foi observado efeito tóxico para a concentração de 300 mg /L de corante, resultando numa remoção de cor entre 81,3 a 97,3%, exceto para o corante vermelho-2, o qual apresentou uma remoção de cor de 65%.

A degradação de corantes azóicos por bactérias anaeróbias geralmente diminui a cor, mas finalizam em aminas aromáticas, as quais são geralmente mais tóxicas que o corante inicial, enquanto que as bactérias aeróbias são restritas a um único corante por vez (SWAMY e RAMSAY, 1999). Podem-se citar as enzimas anaeróbias, a azo redutase, cliva os azo corantes para formar aminas, onde existem muitas dessas que são carcinogênicas e mutagênicas (BANAT *et al.*, 1996; ABADULLA *et al.*, 2000a; CHEN *et al.*, 2003). Além disso, a azo redutase é uma enzima muito específica, fazendo a clivagem apenas de azo corantes (ZIMMERMAN *et al.*, 1982, citado por ABADULLA *et al.*, 2000a).

Um trabalho de Nigam *et al.* (1996), envolvendo bactérias e fungos para degradar azo corante e efluente têxtil, mostrou que, para as bactérias uma extraordinária descoloração foi adquirida sob condições anaeróbias, indicando que em sistemas anaeróbias eles são capazes de quebrar as ligações azo. Com os fungos, houve um crescimento de uma espessura micelial no meio do corante e não mostraram qualquer descoloração indicando que os fungos não são habilitados para quebrar as ligações azo, mas hábeis em outras partes da molécula do corante. As técnicas utilizadas para as análises foram espectrofotometria UV-visível e eletroforese capilar.

Nigam *et al.* (1995), durante uma pesquisa em busca de microrganismos com capacidade de degradação de corantes têxteis em efluentes industriais, isolaram um fungo filamentoso anaeróbio facultativo. Este fungo tem a habilidade de crescimento, tendo o corante como única fonte de carbono, sob ambas as condições (aeróbia e anaeróbia). Foi observado que os corantes não são descoloridos, mas mostraram alterações nos seus espectros na região UV-visível, indicando mudanças de estrutura molecular dos seus centros cromóforos.

Um estudo de biodegradação de azo corantes pela levedura *Cândida zeylanoides* em culturas aeradas foi feita por Martins *et al.* (2003). O meio de cultura continha glicose como fonte de carbono e energia, e seu pH foi controlado entre 5,0-5,2. A extensão da remoção da cor ao meio de cultura foi avaliada através da diminuição da absorbância do sobrenadante. O resultado obtido foi de uma remoção de cor entre 44-90%, após sete dias.

Marcanti-Contato e Corso (1996) realizaram trabalhos sobre processos biosortivos em efluentes têxteis com fungo filamentoso *Aspergillus niger*, sendo comprovado que o mesmo tem grande potencial adsortivo para corantes e substâncias tóxicas, independente da temperatura, mas com melhor atuação em meio ácido.

É importante salientar que os processos biológicos não são destrutivos. Embora o volume dos resíduos possa ser significativamente diminuído, a disposição final das fases sólidas continua sendo um problema sem solução.

### **3.4 Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis por Enzimas Lignolíticas.**

Em função das desvantagens dos sistemas biológicos tradicionais, muitos estudos tendem a verificar o potencial de novas propostas que estão sendo pesquisadas no momento. Dentre estas se podem destacar os estudos envolvendo enzimas ligninolíticas, produzidas a partir de cultura de fungos de decomposição branca. Estima-se que grande parte dos problemas apresentados pelos processos biológicos convencionais poderiam ser contornados com a utilização de reatores enzimáticos (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2002).

A crescente utilização de enzimas, nos tratamentos de poluentes específicos, e recentes avanços biotecnológicos têm possibilitado a produção de enzimas mais baratas e facilmente disponíveis através de melhores procedimentos de isolamento e purificação. As potenciais vantagens do tratamento enzimático quando comparadas a tratamentos convencionais incluem: aplicação em materiais recalcitrantes, atuação em concentrações altas e baixas dos contaminantes, atuação num amplo espectro de pH, temperatura e salinidade, necessidade de aclimatização de biomassa e o fácil processo de controle, entre outros (DURÁN e ESPOSITO, 2000).

Um grande número de enzimas, provenientes de uma variedade de vegetais e microrganismos, vem sendo apresentadas como capaz de desempenhar importantes papéis em diferentes aplicações para tratamento geral dos resíduos. As enzimas podem atuar em compostos recalcitrantes específicos para removê-los por precipitação ou transformação em outros produtos inócuos (DURÁN e ESPOSITO, 2000). Podem também mudar as características de um determinado rejeito para torná-lo mais receptivo ao tratamento, ou auxiliar na bioconversão dos rejeitos em produtos de maior valor agregado (KARAM e NICELL, 1997).

A Tabela 3 mostra exemplos de enzimas e suas aplicações no tratamento de resíduos.

**Tabela 3. Enzimas com potenciais aplicação em tratamento de Resíduos.**

<i>Enzima</i>	<i>Fonte</i>	<i>Aplicação</i>
Alquil-sulfatase	<i>Pseudomonas C12B</i>	Degradação de surfactantes
Amilases: $\alpha$ -amilase Glicoamilase	Bactérias	Hidrólise do amido e produção de glicose
Enzimas celulolíticas Celulase Celobio-hidrolase Celobiase Exo-1,4- $\beta$ -D-Glicosidase	Várias fontes	Hidrólise de lodos celulósicos de papel e celulose para produzir açúcares e álcool, hidrólise de celulose em resíduos sólidos urbanos para produzir açúcar e outras fontes de energia
Quitinase	<i>Serratia marsences</i>	Bioconversão de resíduos de crustáceos em N- acetil glicosamina
Cloro - peroxidase	<i>Caldaromyces fumago</i>	Oxidação de compostos fenólicos
Cianidase	Isoladas de <i>Alcaligenes denitrificans</i>	Decomposição de cianetos
Cianeto hidratase	Fungos tais como: <i>Gloeocercospora sorghi</i> , <i>Stemphylium loti</i>	Hidrólise de cianetos
Heme-oxidase	sangue	Oxidação de fenóis e aminas aromáticas
L-Galactono-lactona oxidase	<i>Candida norvegensis</i>	Conversão de galactose da hidrólise do soro de leite em ácido ascórbico
Lacase	Diversos fungos: <i>Rhizoctonia praticola</i> <i>Fomus annosus</i> <i>Trametes versicolor</i>	Oxidação de fenóis, descoloração de efluentes de branqueamento Kraft, ligação de fenóis e aminas com húmus
Lactases	Bactérias	Processamento de resíduos de laticínios e produção de produtos de maior valor agregado
Lignina peroxidase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Oxidação de fenóis e compostos aromáticos, descoloração de efluentes de branqueamento Kraft
Lípase	Várias fontes	Melhora o desaguamento do lodo
Lisozima	Bactérias	Melhora o desaguamento do lodo
Manganês peroxidase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Oxidação de fenóis monoaromáticos e corantes aromáticos
Paration hidrolase	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Flavobacterium streptomices</i>	Hidrólise de pesticidas organofosfatados
Pectina liase	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Degradação da pectina
Pectina esterase	<i>Clostridium thermosulfurogenes</i>	Degradação da pectina
Peroxidase	Raiz forte, tomate, soja, rabanete, <i>Coprinus macrorrhizus</i>	Oxidação de fenóis, descoloração de efluentes de branqueamento Kraft, desaguamento de lodo
Fosfatase	<i>Citrobacter sp.</i>	Remoção de íons de metais pesados
Proteases	Bactérias, tais como: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas marinoglutinosa</i>	Solubilização de restos de peixe e carne melhorando o desaguamento do lodo
Tirosinase	Cogumelo	Oxidação de fenóis

Fonte: KARAM e NICELL, 1997

Nas últimas décadas, a utilização de enzimas no tratamento de efluentes vem sendo objeto de inúmeros trabalhos. Como exemplo, tem-se a enzima tirosinase, também conhecida como polifenol oxidase ou monofenol oxigenase, que catalisa duas

reações distintas: a orto-hidroxilação de monofenóis, gerando catecóis e a desidrogenação de catecóis, formando quinonas que, sendo instáveis em soluções aquosas, sofrem polimerização não enzimática através de reações oxidativas e nucleofílicas (CAMMAROTA e COELHO, 2001).

Alguns tratamentos enzimáticos vêm sendo estudados com o objetivo de remover grupamentos fenólicos do meio ambiente. A enzima peroxidase é conhecida por sua capacidade de remoção de grupamentos fenólicos e aminas aromáticas de soluções aquosas e também de descoloração de efluentes da indústria têxtil. A peroxidase necessita de peróxido de hidrogênio no processo, enquanto que a tirosinase precisa de oxigênio molecular, tornando este processo menos oneroso que o primeiro. Ambos os tratamentos enzimáticos (com peroxidase e tirosinase) resultam na remoção de grupamentos fenólicos tóxicos dos efluentes industriais, tendo-se em mente que muitos dos corantes empregados na indústria têxtil possuem grupamentos fenólicos em sua estrutura química (DURÁN, 2003).

Nos tratamentos biológicos de efluentes têxteis e de corantes têm-se utilizado enzimas produzidas por fungos. A lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) são heme (ferro-porfirina) enzimas, agindo na presença de peróxido de hidrogênio. A LiP oxida o composto dimetóxi álcool veratrílico ao correspondente aldeído. Álcool veratrílico é usado no teste da LiP e é também um metabólito secundário produzido por muitos fungos de decomposição branca. Este composto aromático induz a produção da LiP e protege a enzima da inativação por peróxido de hidrogênio. A lacase é uma enzima pertencente ao grupo das oxidases que complexam o cobre e é ativada pelo oxigênio. Com a lacase, tem-se tanto a polimerização como a despolimerização de lignina. Na descoloração de efluentes, substratos não fenólicos podem ser oxidados pela lacase na presença de um mediador redox como ABTS (ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ANDER e MARZULLO, 1997).

Entre as enzimas utilizadas para a descoloração está a lacase. Em experimentos com *Pyricularia oryzae*, Chivukula e Renganathan (1995) demonstraram que a lacase proveniente deste fungo é capaz de oxidar corantes azo fenólicos. A ligação azo é susceptível à redução, o que gera aminas aromáticas potencialmente carcinogênicas. A oxidação da lacase pode desintoxicar os corantes azóicos porque sua reação libera as ligações azo sob a forma de nitrogênio molecular, o qual não permite a formação de aminas aromáticas.

Foram realizados estudos com vários fungos da podridão branca (ligninolíticos), visando à descoloração e degradação de efluentes têxteis, conseguindo bons resultados. Esses fungos se tornaram cada vez mais interessantes devido a sua habilidade de degradar poluentes orgânicos recalcitrantes tais como: hidrocarbonetos, poliaromáticos, clorofenóis e bifenilas policlorados (SWAMY e RAMSAY, 1999).

Qualquer forma de descoloração realiza somente a transformação do grupo cromóforo de um corante e não sua completa degradação. No caso a degradação da lignina pode ser convencionalmente dividida em reações de despolimerização, as quais são extracelulares, e em metabolismo dos fragmentos liberados do polímero, o qual é quase sempre intracelular. A evidência apresentada indica que os corantes servem como substratos para os fungos lignocelulíticos e também tem valor determinante no metabolismo secundário deste organismo (GLENN e GOLD, 1983, citado por RODRIGUES, 2003).

Os fungos da decomposição branca têm a habilidade única para degradar/mineralizar um amplo espectro (estruturalmente diverso) de poluentes tóxicos para o meio ambiente. O potencial destes fungos para a biorremediação *in situ* tem sido atribuído à sua habilidade em degradar uma variedade de compostos xenobióticos via um mecanismo de radical livre mediado pelas peroxidases extracelulares - LiP e MnP - e lacase, que são componentes chave para o sistema enzimático. Estas enzimas têm um potencial de oxidação-redução muito elevado e podem oxidar potencialmente xenobióticos que não são atacados por outras peroxidases (DURÁN e ESPOSITO, 1997).

Nos estudos de descoloração e capacidade de mineralização de corantes e efluentes têxteis, têm sido utilizados diferentes fungos produtores de enzimas. Pesquisadores da área de biotecnologia têm aumentado o interesse no versátil fungo da decomposição branca *Phanerochaete chrysosporium*. Este fungo é capaz de mineralizar, além da lignina, pelo menos parcialmente, e algumas vezes completamente, uma variedade de poluentes persistentes no ambiente (BALAN e MONTEIRO, 2001).

A biodescoloração de resíduos líquidos e da polpa de papel foi relatada no início dos anos 80, empregando-se basidiomicetos da podridão branca *P. chrysosporium* e *Tinctoria sp.* Vários estudos têm sido conduzidos na remoção de corantes (BANAT *et al.*, 1996). O mecanismo de descoloração de corantes poliméricos por fungos da podridão branca até então parece envolver as enzimas lignina peroxidases, manganês peroxidases e lacases.

Estudos realizados em fungos *Phanerochaete chrysosporium*, que possuem o processo de descoloração iniciado por peroxidases, revelaram que o fungo foi muito eficiente na degradação de azo-corantes. Dez diferentes tipos de corantes foram testados com o caldo enzimático bruto. Muitos dos corantes perderam 100% de sua cor e a eficiência de descoloração destes corantes pelo fungo varia dependendo da estrutura e complexidade do corante (KUNZ *et al.*, 2002). Já o fungo *Phanerochaete sajor-caju*, que possui o processo de descoloração iniciado pela lacase, revelou uma alteração do grupo cromóforo, ocorrendo à perda de cor.

Wang e Yu (1998) realizaram experimentos de adsorção e biodegradação de corantes pelo fungo *Trametes versicolor*. Em seus trabalhos, a adsorção se deu na primeira hora de contato entre os corantes e as hifas fúngicas. A capacidade de adsorção e afinidade do fungo ao corante depende da estrutura de cada corante. O micélio saturado pode ser regenerado, ou por dessorção física, ou por degradação enzimática, podendo o mesmo ser aproveitado para uma segunda adsorção.

O acentuado desenvolvimento da microbiologia tem propiciado muitas alternativas que viabilizam o tratamento biológico de efluentes industriais. Trabalhos recentes relataram que diferentes efluentes são tratáveis por meio desses processos.

Foi estudada a descoloração de vários corantes e de um efluente industrial utilizando o fungo *P. chrysosporium* em culturas estáticas e sob agitação. Tanto o efluente como os corantes foram descoloridos com porcentagens de remoção de cor que variam entre 20-100%. O grau de descoloração para todos os corantes em condições estáticas foi menor que nas culturas que ficaram sob agitação e também dependeu da concentração da biomassa. Os autores compararam os diferentes corantes, com as diferentes porcentagens de descoloração, e chegaram a um consenso que pequenas diferenças estruturais podem afetar fortemente o grau de descoloração. Mais estudos de células homólogas de corantes com diferentes fungos são necessários para estabelecer a relação entre estrutura e degradabilidade (SANI *et al.*, 1998).

Spadaro *et al.* (1992) demonstraram a capacidade de mineralização deste fungo para uma variedade de azo corantes, sendo que a habilidade de descoloração e/ou degradação do fungo dependeu da natureza dos grupos substituintes dos anéis aromáticos dos corantes.

Kirby *et al.* (1995) testaram a descoloração de nove corantes têxteis sintéticos, pelo fungo *P. chrysosporium*, que descoloriu seis desses nove corantes na presença de



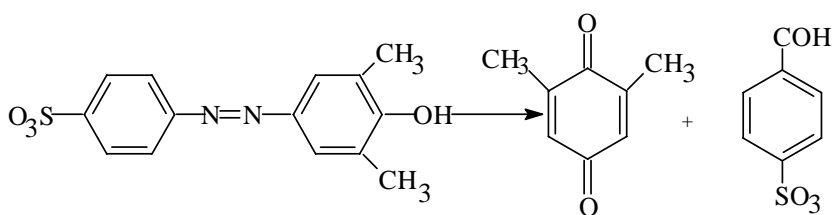
glicose, e três corantes têxteis foram descoloridos na ausência de uma fonte de carbono primária. Após sete dias a descoloração foi completa, porém o papel da lignina peroxidase foi obscuro; certos corantes podem ser metabolizados como única fonte de carbono e energia pelo *P. chrysosporium*.

A descoloração de corantes azo, trifenilmetano, heterocíclico e polimérico, por isoenzimas da lignina peroxidase de *P. chrysosporium*, foi estudada por Ollikka *et al.* (1993). Dez diferentes tipos de corantes foram testados com o caldo enzimático bruto. Muitos desses corantes perderam 75% de sua cor inicial; somente os corantes vermelho de Congo, poly R-478 e poly T-128 foram menos descoloridos que os outros 54, 46 e 48%, respectivamente. A habilidade das isoenzimas em descolorir os corantes na presença do álcool veratrílico foi comparada àquela da preparação do caldo enzimático bruto, sugerindo que a lignina peroxidase tem um papel importante na descoloração e a manganês peroxidase não é necessária para iniciar a degradação destes corantes. Na ausência de álcool veratrílico, a atividade de descoloração das isoenzimas foi reduzida, sugerindo que o álcool veratrílico atua como mediador na reação catalítica.

Rosalen *et al.* (2004) estudaram a degradação de nove corantes têxteis dos grupos reativos e dispersos, através dos fungos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor - caju*, produtores de enzimas lacases e peroxidases. Ambas as espécies apresentaram boa capacidade de degradação dos corantes, sendo que, na maioria dos casos, a degradação acompanhou a taxa de crescimento dos fungos. Por outro lado, alguns dos corantes testados apresentaram degradação somente após o micélio crescer por toda a superfície do meio.

Chivukula *et al.* (1995) estudaram a oxidação catalisada de azo corantes sulfonados por LiP do fungo de decomposição branca *P. chrysosporium*, gerando novos sulfofenil hidroperóxidos. Um mecanismo para degradação de azo corantes sulfonados é proposto baseado na identificação dos produtos. As características relevantes desse mecanismo são a liberação de ligações azo com o nitrogênio e a geração de um novo sulfofenil hidroperóxido, que ainda não foi identificado em nenhum sistema químico ou biológico.

A estrutura química do sulfofenil hidroperóxido é apresentada na Figura 5.



**Figura 5: Estrutura química do sulfofenil hidroperóxido**

Na degradação microbiana de compostos aromáticos, a oxigenação do anel aromático prepara o anel para posteriores degradações. A incorporação de oxigênio no anel aromático em degradação peroxidativa de azo corantes sulfonados poderia auxiliar na subsequente degradação do anel aromático (CHIVUKULA *et al.*, 1995).

Tipos diferentes de organismos podem ser utilizados para o tratamento de efluentes que apresentam coloração. Swamy e Ramsay (1999) comentam que muitas pesquisas sobre a degradação de corantes por fungos de decomposição branca têm utilizado *P. chrysosporium* (através das enzimas lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase). Embora existam poucos estudos de descoloração de corantes por *Trametes versicolor*, este organismo tem sido investigado por sua descoloração de efluentes Kraft fortemente coloridos. Estudos prévios se restringem a uma simples descoloração de um único corante. Uma vez que o efluente têxtil contém uma variedade de corantes, sucessivas descolorações de um único corante não indicam adequadamente a eficiência de um organismo para o processo de descoloração. Um sistema de biodescoloração deveria manter alta atividade sobre repetidas exposições dos vários corantes. Na pesquisa desenvolvida por Swamy e Ramsay (1999), foi avaliada a capacidade de cinco fungos em descolorir diferentes corantes em condições onde os corantes encontravam-se isolados ou misturados, e ainda sob repetições desses corantes.

Observaram que o fungo *Trametes versicolor* descoloriu rapidamente repetidas adições de diferentes corantes e as misturas dos corantes, sem nenhuma adsorção visual dos corantes nos *pellets* do fungo, o que evidencia a ação de enzimas lignolíticas.

A adsorção e degradação de três corantes com grupos cromóforos comercialmente representativos (azo, antraquinona e índigo) foram estudadas utilizando-se o micélio vivo e morto do fungo *Trametes versicolor*. A adsorção física e a degradação enzimática da molécula do corante adsorvido também foram estudadas. Os autores encontraram uma atividade enzimática para a peroxidase de 78UL<sup>-1</sup> e para a lacase de 16.000UL<sup>-1</sup>. As enzimas intracelulares e extracelulares removeram e

degradaram os corantes antraquinona e índigo adsorvidos, enquanto que os azo corantes foram degradados apenas por enzimas extracelulares (WANG e YU,1998).

Swamy e Ramsay (1999) estudaram os efeitos da concentração de  $Mn^{2+}$  e  $NH_4^+$  sob a produção de lacase, manganês peroxidase (MnP), e a descoloração de um corante azo por *Trametes versicolor*. Foram detectadas MnP e lacase, mas não LiP. Para baixas concentrações de  $Mn^{2+}$  e nitrogênio, o fungo descoloriu sucessivamente oito adições do corante, sem nenhuma adsorção visível na biomassa micelial. Em altas concentrações de  $Mn^{2+}$ , a produção de MnP aumentou e a lacase diminuiu, mas as sucessivas descolorações do corante não foram alteradas. Fatores indicaram que as enzimas isoladas não são suficientes para a descoloração.

Foi avaliada a descoloração de corantes artificiais por peroxidase extracelular do fungo *Pleurotus ostreatus*. Tipos diferentes de corantes, incluindo trifenil metano, heterocíclico, azo e poliméricos foram descoloridos. O melhor resultado obtido foi com o corante azul do bromofenol (98%), da classe do trifenil metano. Corantes heterocíclicos, como azul de metileno e azul de toluidina O, foram os que menos removeram cor (10%), mostrando certa resistência à oxidação enzimática.

Rodríguez *et al.* (1999) utilizaram enzimas produzidas por fungos da decomposição branca para descolorir 23 corantes industriais. Atividades da lacase, MnP, LiP e aril álcool oxidase foram determinadas nos extratos brutos das culturas de um fungo. O *P. ostreatus* foi capaz de descolorir 12 dos 23 corantes “*in vivo*” enquanto que o fungo *P.chrysosporium* descoloriu somente cinco. Utilizando o extrato bruto, *P. ostreatus* descoloriu apenas cinco corantes mostrando que outro mecanismo enzimático poderia estar envolvido nos experimentos de descoloração “*in vivo*”. Este fungo apresentou uma atividade elevada para lacase e MnP. O fungo *Trametes hispida* apresentou também elevada atividade para lacase, o que é consistente com a elevada atividade de descoloração dos corantes.

Knapp e Newby (1999) utilizaram o fungo da decomposição branca *Coriolus versicolor* para descolorir um efluente contendo o grupo cromóforo diazo acoplado; o resultado obtido após o tratamento foi uma descoloração de 70-80%.

Azmi *et al.* (1998) descreveram detalhadamente diferentes métodos de tratamento para efluente contendo corantes da classe de trifenil metano e verificaram que tipos diferentes de organismos, tal como bactéria, leveduras e fungos, tiveram desempenho análogo em descolorir e degradar diferentes corantes trifenil metano.

Recentemente, vários trabalhos relacionados com a remediação de efluentes industriais e corantes foram publicados utilizando a lignina peroxidase (LiP), em sua forma livre e imobilizada (PERALTA-ZAMORA,1998).

Ollikka *et al.* (1993) obtiveram 54% de descoloração do corante Congo Red, na presença de preparação crua de lignina peroxidase e peróxido de hidrogênio; esta enzima utiliza o Congo Red como substrato. Vyas e Molitoris (1995), citado por Selvan (2003), relatam que lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase participam na descoloração de corantes.

Robinson *et al.* (2001) estudaram quatro fungos da degradação branca, *Bjerkandera adusta*, *Phlebia tremellosa*, *Pleurotus ostreatus* e *Cariolus versicolor*; foram testados para produzir a lignina peroxidase (LiP), Manganês peroxidase (MnP), e lacase, com deficiência de nitrogênio e outros componentes. Os fungos *Bjerkandera adusta*, *Phlebia tremellosa*, foram selecionados devido a sua atividade enzimática elevada, na degradação de cinco tipos de corantes de efluente têxtil. As experiências da degradação foram realizadas em alta concentração de nitrogênio (relação de C:N=1.6:1) e N-limitado (116:1) sendo que a concentração do corante era 100mg/L. O fungo *Bjerkandera adusta* removeu 85% do corante em 7 dias; *Phlebia tremellosa* teve 79% de remoção em 9 dias, em meios com alta concentração de nitrogênio. Em meios com concentração limitada de nitrogênio, 86% do efluente foram degradados em 9 dias pela *Bjerkandera adusta*, e 74% pela *Phlebia tremellosa*, em 11 dias. A adição do nitrogênio não teve nenhum efeito substancial na degradação do corante pelo *Bjerkandera adusta*, com um aumento na percentagem de remoção para *Phlebia tremellosa*. O *Pleurotus ostreatus* e *Cariolus versicolor* não produziram atividade enzimática suficiente; sendo assim não foram utilizados nos experimentos para degradação de efluentes têxteis.

Abadulla *et al.* (2000b) estudaram preparações de enzimas de *Pleurotus ostreatus*, *Schizophyllum commune*, *Neurospora crassa*, *Polyporus sp.*, *Trametes villosa*, *Myceliophthora thermophila* que descoloram eficientemente uma variedade de corantes diferenciados estruturalmente. No entanto, a reação inicial depende da taxa individual de enzima (lacase, LiP e MnP), na preparação. Alguns auxiliares de tingimento diminuem a taxa de descoloração. Assim, o efeito dos auxiliares de tingimento sobre a atividade da enzima precisa ser considerado quando se avaliar um novo processo.

*Phanerochaete chrysosporium* mostrou biodegradar os corantes azo e heterocíclicos, Orange II, Tropaeolin O, Congo Red e Azure B. A extensão da remoção da cor dependeu da complexidade do corante, disponibilidade de nitrogênio no meio, atividade ligninolítica da cultura, e do metabolismo secundário. No entanto, na presença de lignina peroxidase purificada, sofreram um processo de descoloração, em alguns casos, em menor extensão quando comparado com o obtido na presença do fungo e apresentaram outros metabólitos secundários. Concluí-se que embora as enzimas ligninas peroxidase estejam envolvidas na degradação desses corantes azo e heterocíclicos, inúmeras outras enzimas ou sistemas enzimáticos também fazem parte do processo de quebra desses corantes (CRIPPS *et al.*, 1990).

Kirby *et al.* (1995) estudaram a descoloração de um efluente têxtil artificial pelo fungo da podridão branca (*Phanerochaete chrysosporium*), que produz as enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase. Nos ensaios de descoloração, o papel da LiP não ficou claro, pois somente pouca atividade da enzima foi detectada no processo de descoloração dos vários corantes sintéticos estudados separadamente e misturados (efluente artificial). Nesse estudo, a concentração dos corantes foi de 0,5g/L, na presença de glicose (10g/L). Seis corantes testados foram descoloridos, enquanto que na ausência glicose apenas três. Os resultados sugerem que uma fonte primária de carbono (glicose) é essencial para uma descoloração extensiva do corante; no entanto, alguns corantes puderam ser metabolizados como única fonte de carbono e energia pelo *Phanerochaete chrysosporium*.

Culturas lignolíticas de inúmeros fungos da podridão branca têm sido documentadas por sua capacidade de degradar e descolorir vários corantes. O envolvimento de MnP e LiP foi demonstrado na via de degradação de alguns dos corantes. Entretanto, espera-se que os fungos de degradação branca se diferenciam na sua habilidade e capacidade de degradar corantes com base nas suas diferenças qualitativas e quantitativas na produção dessas enzimas. Tais corantes também podem oferecer formas para diferenciação entre atividades enzimáticas de peroxidases específicas lignilíticas.

Segundo Durán e Esposito (2000), a implementação do tratamento de águas à base de enzima pode ter um custo muito alto. As enzimas que estão sendo investigadas até agora são caras devido ao alto custo envolvido em seu isolamento, purificação e produção.

### 3.5 Enzimologia Aplicada à Indústria Têxtil

Enzimas são proteínas que apresentam atividade catalítica. A complexa estrutura molecular enzimática é majoritariamente constituída por uma parte protéica, porém a ela podem estar integradas outras moléculas como carboidratos e lipídeos. Para apresentar atividade catalítica, algumas enzimas requerem a participação de moléculas menores (co-fatores) de natureza não protéica. Os cofatores podem ser íons ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  etc.) ou moléculas orgânicas (coenzimas). Exemplos de coenzimas são os dinucleotídeos (NAD, NADP, FAD), e a coenzima A, entre outros.

Há uma grande variedade de enzimas, a maioria delas são encontradas em pequena quantidade. Algumas são produzidas em grandes quantidades por certos microrganismos que a excretam para o meio externo. As enzimas extracelulares são capazes de digerir materiais nutritivos insolúveis, como celulose, proteínas e amido. Algumas dessas enzimas são usadas em alimentos, bebidas, laticínios, nas indústrias farmacêuticas, têxtil e de detergentes. Sua utilização é feita em processos biotecnológicos industriais, ajudando a reduzir a poluição, muitas vezes substituindo processos químicos nefastos ao meio ambiente.

Enzimas apresentam especificidade por seus substratos (reagentes) e produtos em escala bem maior do que os catalisadores químicos, de forma que em uma reação catalisada por enzimas não há formação de produtos laterais.

A atividade catalítica de muitas enzimas pode ser variada em resposta à alteração de substâncias chamadas de moduladores, que diferem em sua natureza dos substratos e produtos da reação.

#### 3.5.1 Nomenclatura e classificação das enzimas.

Um importante passo para estabelecer a nomenclatura científica das enzimas que foi estabelecido, pela União Internacional de Bioquímica (IUB), que através de uma comissão de especialistas-(EC), procurou sistematizar classes e nomes desses biocatalisadores (AQUARONE *et al.*, 2001).

Os nomes sistemáticos incluem o substrato, a reação catalisada e a terminação ase. Alguns exemplos são apresentados a seguir:

Substrato - Tipo de reação catalisada (sufixo ase);

Substrato A: Substrato B – Tipo de reação catalisada (sufixo ase);

Doador de elétrons: Aceitar elétron – oxidoreductase

Doador: Aceptor – Grupo transferido – transferase

Substrato – Grupo hidrolisado – Hidrolase;

O novo sistema de classificação divide as enzimas em seis classes principais, nas quais estão incluídas subclasses de acordo com o tipo de reação catalisada. De acordo com esta sistemática, cada enzima é designada por um Nome Recomendado, usualmente pequeno e apropriado para o uso diário, um Nome Sistemático, o qual identifica a reação catalisada, e um Número de Classificação, o qual é usado quando uma identificação precisa é necessária.

As enzimas podem ser classificadas de acordo com vários critérios. O mais importante foi estabelecido pela União Internacional de Bioquímica (IUB), e estabelece 6 classes.

**1 Oxidorredutases:** São enzimas que catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja: reações de oxi-redução. São as desidrogenases, redutases e as oxidases.

**2 Transferases:** Enzimas que catalisam reações de transferência de grupamentos funcionais como grupos amina, fosfato, acil, carboxil, etc. Como exemplo tem-se as quinases e as transaminases.

**3 Hidrolases:** Catalisam reações de hidrólise de ligação covalente. Exemplo: as peptidases.

**4 Liases:** Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico. As desidratases e as descarboxilases são exemplos dessa classe.

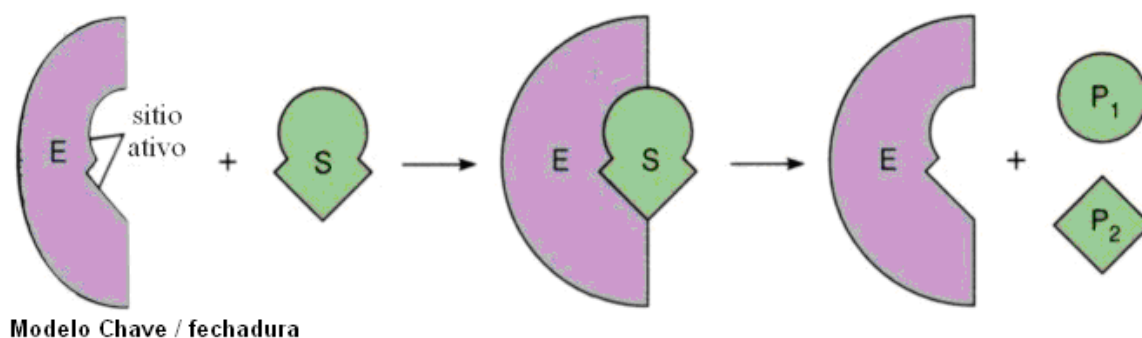
**5 Isomerases:** Catalisam reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos. As epimerases são exemplos dessa classe.

**6 Ligases:** Catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes, sempre às custas da energia (ATP). Como exemplo, tem-se as sintetases.

### 3.5.2 Sítio ativo de ligação/ especificidade

As enzimas são muito específicas para seus substratos; esta especificidade pode ser relativa a apenas um substrato ou a vários substratos ao mesmo tempo. Esta especificidade se deve à existência, na molécula da enzima, de um local denominado sítio ativo de ligação. O sítio ativo de ligação de uma enzima é dado por um arranjo tridimensional especial dos aminoácidos de uma determinada região da cadeia polipeptídica, geralmente complementar à molécula do substrato.

O modelo **Chave/Fechadura** prevê um encaixe perfeito do substrato no sítio de ligação, que seria rígido como uma fechadura, conforme ilustrado na Figura 6.

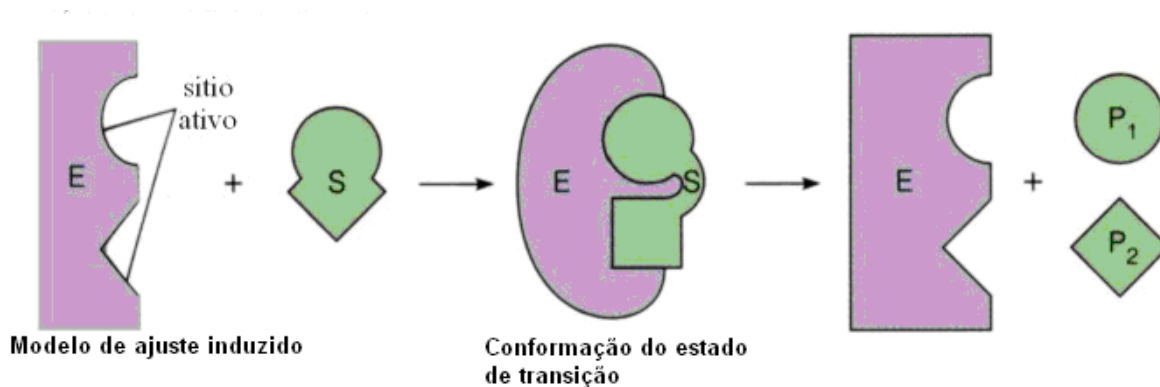


**Figura 6 – Modelo chave / fechadura.**

O modelo do **Ajuste Induzido** prevê um sítio de ligação não totalmente rígido na sua estereoquímica, mas sim moldável à molécula do substrato; a enzima se ajustaria à molécula do substrato, e vice e versa, conforme ilustrado na Figura 7.

Devido à conformação complexa da enzima, à singularidade do seu centro ativo e à configuração de seu substrato, uma dada enzima seleciona apenas um substrato ou grupos de substratos para exercer a ação catalítica. Cada enzima catalisa somente uma reação ou, quando muito, um número limitado de reações químicas. O grau de especificidade varia de uma enzima para a outra.





**Figura 7 – Modelo de Ajuste Induzido.**

Ao completar a reação catalítica, a enzima libera o produto e retorna à forma original. O processo ocorre em duas etapas:



### 3.5.3 Cofatores

Os cofatores unem-se às enzimas para melhorar sua atividade.

Coenzimas: São moléculas pequenas, orgânicas não protéicas, termoestáveis, dialisáveis, ligadas fracamente às enzimas. Podem ligar-se momentaneamente à enzima no decurso da reação ( $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$ ) ou ligar-se permanentemente à enzima, junto ao centro ativo ou constituírem o próprio centro ativo.

Cofator metálico: São cátions e ânions que agem como ativadores ligados fracamente ou firmemente à enzima. Ex:  $\text{Cl}^-$  (alfa amilase),  $\text{Mg}^{++}$  (fosfatases),  $\text{Ca}^{++}$  (lipases),  $\text{Zn}^{++}$  (LDH).

### 3.5.4 Cinéticas de reações enzimáticas

A cinética enzimática é à parte da Enzimologia que estuda a velocidade das reações enzimáticas bem, como os fatores que a influenciam. Seus objetivos são:

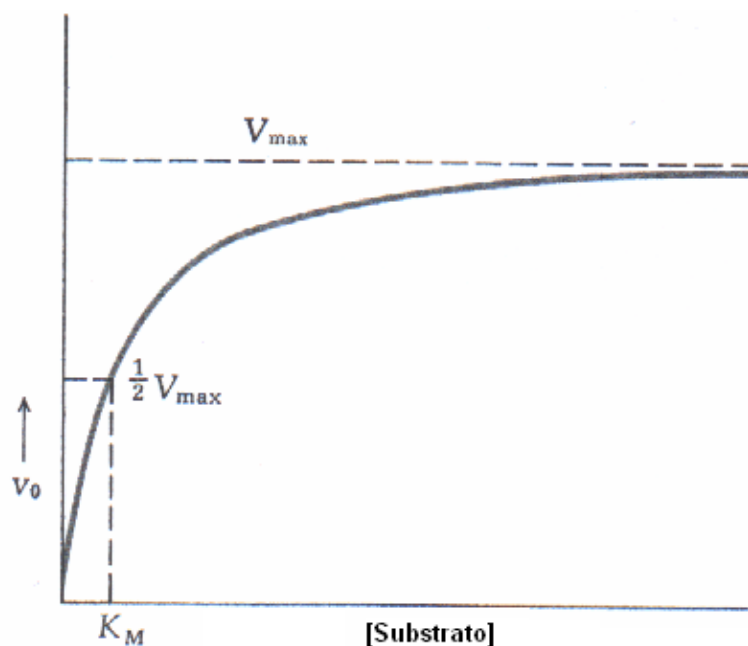
- Medir as velocidades das transformações que se processam;

- Estudar a influência de condições de trabalho (como por exemplo, concentrações dos reagentes e das enzimas, temperatura, pH, concentrações de ativadores e inibidores) naquelas velocidades;
- Correlacionar (quer por meio de equações empíricas, quer por meio de modelos matemáticos) as velocidades das transformações com alguns dos fatores que as afetam;
- Colaborar na otimização do processo considerado;
- Estabelecer critérios para o controle do processo;
- Projetar o reator mais adequado;

Os princípios gerais da cinética das reações químicas aplicam-se às reações catalisadas enzimaticamente, embora estas também mostrem um padrão distinto que não é usualmente encontrado nas reações não enzimáticas: saturação com o substrato.

Na Figura 8 pode ser observado o efeito da concentração de substrato na taxa de uma reação catalisada por uma enzima. Em concentrações de substrato muito baixas, a velocidade inicial de reação  $v_0$  é quase proporcional à concentração do substrato e a reação é de primeira ordem em relação ao substrato. Entretanto, à proporção que a concentração do substrato aumenta, a taxa inicial passa a crescer menos, significando que não é mais linearmente proporcional à concentração do substrato. Nessa zona, as ordens das reações estão misturadas.

Com o posterior aumento da concentração do substrato, a taxa de reação torna-se essencialmente independente da concentração do substrato e aproxima-se assintoticamente de uma taxa constante. Nesses valores de concentrações de substrato, a reação é de ordem zero em relação ao substrato e a enzima é tida como estando saturada com o substrato.



**Figura 8 – Cinética enzimática**

Em 1913, a teoria da ação e cinética enzimática foi desenvolvida por dois cientistas chamados L. Michaelis e M. L. Menten, na qual uma reação enzimática pode ser expressa pela seguinte equação, considerando-se apenas um substrato:



As moléculas de substrato passam por uma série de formas geométricas e são eletricamente alteradas antes de formarem produtos da reação. A energia livre destes intermediários, especialmente aqueles que se encontram em estado de transição mais instáveis, é um fator determinante da taxa de reação. As enzimas têm muito maior afinidade por estes estados de transição do substrato do que têm por formas mais estáveis. Como esta interação abaixa a energia destes estados de transição críticos, as enzimas podem acelerar uma determinada reação.

A partir do modelo proposto por estes pesquisadores, desenvolveu-se uma equação que nos permite demonstrar como a velocidade de reação varia em função da concentração do substrato, a qual está a seguir descrita:

$$V_0 = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_m + [S]}$$

Esta equação relaciona a velocidade ( $V_0$ ), a velocidade máxima ( $V_{max}$ ) e a concentração inicial de substrato com a constante de Michaelis – Menten ( $K_m$ ). O  $K_m$  de um substrato é a concentração do substrato na qual a velocidade inicial de reação equivale à metade da velocidade máxima. Para reações que envolvem um substrato o  $K_m$  é expresso em moles por litro e é independente da concentração da enzima.

A constante de Michaelis–Menten de uma enzima é, portanto, uma característica muito importante e fundamental, não apenas matematicamente na determinação da velocidade da reação catalisada, como também na avaliação da atividade e na purificação das enzimas nos tecidos.

### **3.5.5 Fatores externos que influenciam na velocidade de uma reação enzimática**

#### **3.5.5.1 Influência do pH**

Geralmente as enzimas são ativas numa faixa restrita de pH e, na maioria dos casos, há um pH ótimo definido. O efeito do pH sobre a afinidade pode ser eliminado utilizando-se altas concentrações de substrato, de modo a se saturar a enzima em todos os valores de pH. O efeito do pH sobre a enzima deve-se às variações no estado de ionização dos componentes do sistema à medida que o pH varia. Como as enzimas são proteínas que contêm muitos grupos ionizáveis, elas existem em diferentes estados de ionização; por isso, a atividade catalítica é restrita a uma pequena faixa de pH.

A atividade da enzima deve ser então medida no pH ótimo. A estabilidade de uma enzima depende de muitos fatores como: temperatura, força iônica, natureza química do tampão, concentração de vários preservativos, concentração de íons metálicos contaminantes, concentração de substratos ou cofatores de enzima e concentração da enzima.

### 3.5.5.2 Efeito da temperatura

A atividade catalítica das enzimas é altamente dependente da temperatura, como no caso dos catalisadores convencionais, porém; à medida que se eleva a temperatura, dois efeitos ocorrem simultaneamente: a taxa de reação aumenta, como se observa na maioria das reações químicas, e a estabilidade da proteína decresce devido à desativação térmica.

A influência da temperatura sobre a atividade da enzima é, geralmente, representada pela alteração em termos de atividade ou velocidade de reação, ou seja, a maioria das reações químicas se processa a uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta.

O efeito da temperatura sobre a atividade de uma enzima depende de vários fatores que incluem o pH e a força iônica do meio, além da presença ou ausência de ligantes. Os substratos frequentemente protegem as enzimas da desnaturação pelo calor.

No processo de desnaturação térmica, ocorre a perda da atividade biológica da enzima.

Toda enzima tem uma temperatura ótima para que atinja sua atividade máxima, ou seja, é a temperatura máxima na qual a enzima possui uma atividade constante por um período de tempo.

### 3.5.6 Atividade Enzimática

A atividade enzimática é a quantidade de substrato que em uma reação enzimática particular é convertida em produto por unidade de tempo em condições determinadas. O ensaio quantitativo da atividade enzimática é efetuado de maneira mais rápida e conveniente quando o substrato ou produto são compostos coloridos ou que absorvem a luz na região do UV, pois a velocidade de aparecimento ou desaparecimento de um produto ou substrato que absorva luz pode ser acompanhada com um espectrofotômetro, dando um registro contínuo do processo.

U – Unidade internacional de atividade enzimática

**1 U = 1  $\mu$ mol/min** – quantidade de enzima que converte 1 $\mu$ mol de substrato por minuto em condições padronizadas.

### 3.5.7 Isoenzimas

São formas múltiplas de uma determinada enzima que ocorrem em uma espécie do organismo ou mesmo em uma única célula. Essas formas múltiplas podem ser detectadas ou separadas por eletroforese em gel dos extratos celulares, uma vez que elas são codificadas por genes diferentes, diferem na composição de aminoácidos e, em consequência, em seus valores de pH isoelétricos.

### 3.5.8 Imobilização de Enzimas

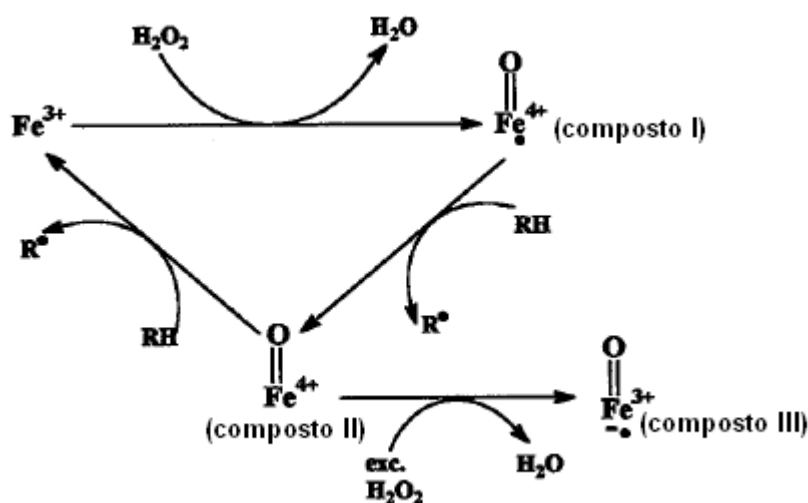
Em geral é universalmente aceito que, para aumentar a potencialidade dos sistemas enzimáticos no tratamento de resíduos industriais, a utilização de formas enzimáticas imobilizadas é de fundamental importância. Consequentemente, muitos suportes tem sido utilizados para a imobilização de enzimas de interesse. De maneira geral, a utilização de enzimas suportadas tem-se mostrado bastante conveniente, principalmente em função do aumento da sua estabilidade química e térmica.

- Muitas enzimas não são suficientemente estáveis dentro das condições operacionais, e elas podem perder a atividade catalítica devido as altas temperaturas, autooxidação, auto-digestão e/ou desnaturação pelo solvente, e solutos ou devido a danos físicos.
- As enzimas são moléculas solúveis em água, seu uso repetido, o qual é importante para viabilizar um processo econômico, é problemático devido ao fato que elas são difíceis de serem recuperadas deste meio além da separação dos substratos e produtos.
- A produtividade de processos industriais, medidas de rendimento em função do tempo, é frequentemente baixa devido ao limite tolerado pela enzima para altas concentrações de substrato(s) e produto(s).

Estes problemas podem ser solucionados pela imobilização de enzimas e biocatalizadores (CASTILO *et al*, 1997). Deve-se sempre considerar que a atividade da enzima seja mantida após a imobilização, ou seja, não deverão ocorrer alterações estruturais que levam a mudanças em seu sítio ativo.

### 3.6 Enzimas peroxidases

Esta família de enzimas é assim chamada porque depende do peróxido de hidrogênio para se tornar ativa. A Figura 9 apresenta o ciclo catalítico de uma peroxidase. Em um ciclo normal, a forma férrica da enzima é oxidada por peróxido de hidrogênio ao radical oxi-ferril, conhecido como composto I. Este composto é então reduzido pela transferência de um elétron do substrato (ex: lignina) para a forma conhecida como composto II. Uma subsequente transferência de elétron de uma molécula de substrato para enzima faz com que esta retorne a sua forma inicial. O composto III refere-se à forma inativa da enzima.



**Figura 9 : Ciclo catalítico da peroxidase**

(Fonte: DEURZEN *et al.*, 1997, TIMOFEEVSKI *et al.*, 1998).

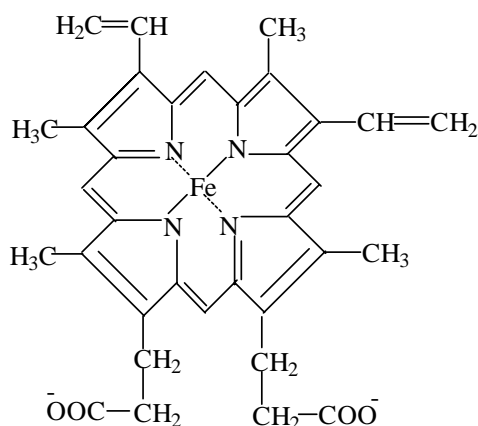
A remoção catalítica de fenóis e outros compostos aromáticos, incluindo substâncias cromogênicas, de efluentes industriais utilizando enzima peroxidase e peróxido de hidrogênio, vem sendo foco de pesquisas extensivas. A técnica pode ser uma alternativa quando os métodos convencionais de tratamento, como o tratamento

biológico, o uso de carvão ativado e técnicas de oxidação avançada, não forem eficientes devido à natureza do efluente (NICELL *et al.*, 1993). Esta técnica apresenta especial vantagem para o tratamento de soluções fortemente concentradas, pois a reação pode ser procedida sem diluição da corrente poluída, e em um curto tempo de retenção. Para uma planta de tratamento de efluentes baseada na oxidação biológica, onde não há disponibilidade de espaço físico, esta característica é muito desejável.

Muitas enzimas, como é o caso das peroxidases, ocorrem em mais de uma forma molecular em uma mesma espécie, em um mesmo tecido, ou até mesmo, em uma mesma célula. Nestes casos porém, as diferentes formas da enzima, ou isoenzimas, catalisam a mesma reação, diferem em suas propriedades cinéticas, composição e sequência de aminoácidos. A presença de múltiplas isoenzimas torna difícil a atribuição de funções biológicas específicas às isoformas individualmente. Portanto, a função fisiológica de cada isoenzima encontra-se apenas parcialmente compreendida, devido em parte, a complexidade das isoenzimas presentes em um dado tecido (GILLIKIN e GRAHAM, 1991, citado por WILBERG, 2003).

Conhecida também como peroxidase da raiz forte (HRP- *Horseradish* peroxidase) é estruturalmente o arquétipo das proteínas *heme*. Ela é uma glicoproteína globular com massa molecular de  $42000 \text{ g mol}^{-1}$ , que possuem uma parte protéica (apoenzima) de aproximadamente  $34\,000 \text{ g mol}^{-1}$  e o restante é composto pelo grupo prostético (tipo *heme*) que contém o cofator ligado fortemente ao sítio ativo da enzima. Nos vegetais superiores, o cofator ferro no seu estado de oxidação +3 encontra-se ligado a uma molécula de porfirina, compondo o grupo *heme* (Figura 10), que promove a doação de elétrons na reação de oxidação dos seus substratos aromáticos.





**Figura 10 – Grupo prostético das enzimas peroxidase denominado grupo *heme*.**

Fonte: WILBERG, 2003.

Mais de 40 isoenzimas de HRP foram detectadas e classificadas em três grupos como enzimas ácidas, neutras ou básicas. Pouco se sabe sobre suas atividades relativas e, apesar de catalisarem as mesmas reações, diferem entre si profundamente quanto às propriedades cinéticas e físico-químicas. Considera-se que as enzimas utilizadas comercialmente são constituídas por apenas uma isoenzima, ou que as atividades das principais isoenzimas presentes são basicamente as mesmas, e que as demais não interferem na atividade total.

O uso da HRP tem sido aplicado na polimerização de fenólicos, despolimerização da lignina, S-oxidação de dibenzotiofeno, polimerização do radical acrilamida e branqueamento de corante (DURÁN *et al.*, 2001).

O papel das peroxidases de origem microbiológica na polimerização de ácidos fenólicos é reconhecidamente o de transformação de substâncias aleloquímicas em substâncias húmicas estáveis e não tóxicas. Na superfície das raízes de diversas plantas, inclusive da raiz forte, as enzimas atuam como primeira linha de defesa contra o ataque por organismos e aleloquímicos secretados por outras plantas vizinhas. O mecanismo proposto foi o de minimização da absorção de compostos tóxicos (como fenóis e aminas aromáticas) para o interior da planta, através da sua precipitação na interface das raízes com o solo (ADLER *et al.*, 1994).

Na indústria de papel e celulose a peroxidase é empregada na etapa de branqueamento da polpa e no tratamento de seus efluentes. Na indústria têxtil é utilizada para melhorar o branqueamento em lavanderias e inibir a transferência de cor durante a

lavagem. Também na indústria têxtil, é empregada para a remoção do excesso de corante da água de lavagem de tecidos tingidos. Este procedimento diminui o risco de redeposição do corante no tecido, mesmo utilizando menor volume de água de lavagem. As vantagens associadas são a diminuição do tempo de processo, de energia requerida e principalmente do volume de água, o que reflete também em menor volume de coloração dos efluentes líquidos do processo.

Pokora e Johnson (1993), citado por Wilberg (2003), apresentaram um método para o tratamento de efluentes, lodos e solos poluídos por compostos orgânicos e/ou metais pesados utilizando peroxidase. Descreveram a ação desta enzima como sendo basicamente a geração de radicais livres e oxidação, atuando sobre a remediação dos efeitos danosos provocados por estes compostos ou misturas entre eles. Os compostos halogenados (AOX) são oxidados produzindo haletos; fenóis e aminas são polimerizados; metais pesados (Hg, Tl, Sb, Te, Pb, As, Se, Bi) são oxidados a sua forma iônica; substâncias cromóforas são degradadas ou precipitadas. O tratamento resulta na conversão dos poluentes em materiais insolúveis e não prejudiciais ao meio ambiente, que podem ser deixados na corrente tratada ou removidos em uma etapa posterior, por resina trocadora de íons, quelação, filtração, sedimentação ou outros métodos apropriados para cada caso.

Diversos estudos foram realizados com o objetivo de identificar as variáveis do processo que afetam a eficiência da HRP e que são importantes para o desenvolvimento de um sistema de tratamento de efluentes, procurando torná-la viável técnica e economicamente. Dentre outras variáveis importantes, a dosagem ótima de  $H_2O_2$ , dosagem ótima de peroxidase, pH, temperatura da reação, tempo de contato, repetida aplicação de enzima imobilizada, e concentração de corante tem sido investigados para otimizar as condições do sistema (MOHAN *et al.*, 2005).

A HRP é conhecida por ser eficaz na quebra de compostos azo aromáticos na presença de  $H_2O_2$  e por degradar e precipitar importantes corantes azo industriais (MOHAN *et al.* 2005; KIM *et al.* 2005). Estudos prévios mostraram que vários compostos fenólicos e compostos azo foram degradados pelo sistema HRP-  $H_2O_2$ . Também foi demonstrado que a imobilização da HRP melhora as condições e a eficiência de remoção comparativamente à forma livre.

Alguns autores mostram que a destruição oxidativa de compostos coloridos é estimulada significativamente através da utilização de enzimas oxidativas (BHUNIA *et*

*al.*, 2002; REGALADO *et al.*, 2004). Enzimas como a lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), ambas associadas com a degradação da lignina, estão envolvidas na descoloração de corantes sintéticos azo, como o Orange II, entre outros (CHIVUKULA *et al.*, 1995; REGALADO *et al.*, 2004)

Recentemente Bhunia *et al.* (2002) mostraram que a HRP pode ser efetiva degradando e precipitando importantes azo corantes industriais, tais como Remazol. Este corante usado industrialmente contém pelo menos um grupo cromóforo em sua estrutura, sendo assim um possível substrato da HRP.

Ferrer *et al.* (1991), estudaram a imobilização da HRP e sua aplicação na descontaminação de efluentes. A remoção de cor de efluentes Kraft por HRP na forma livre foi de 20%, mas a enzima imobilizada, em CNBr-Sepharose 4B, aumentou a descoloração por um fator de 2,7 vezes em 48 horas (54%). Foi avaliada também a habilidade de ligação da HRP em três diferentes matrizes de reatores: filtro de papel e celulose, bolas de nylon e tubos de nylon, para remover 4-clorofenol de soluções aquosas. Os resultados indicaram que 80% da eficiência de remoção podem ser obtidos se a atividade enzimática não for fator limitante no reator.

Segundo Durán e Esposito (2000), a imobilização da HRP em vários suportes e sua utilização para descontaminação de efluentes de indústrias de papel e têxteis tem sido avaliada. Dentre os suportes, a resina de troca iônica Amberlite IRA – 400 apresentou os melhores resultados. Obteve-se acima de 50% de descoloração do efluente Kraft, após 4 horas de tratamento enzimático, sem nenhuma adsorção significativa de espécies coloridas pelo suporte (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 1998).

A imobilização de HRP, sobre vitro-cerâmica de fosfato duplo de titânio e lítio poroso, e sua utilização na remediação de efluentes de papel foi estudada por Peralta-Zamora *et al.* (1998). Foi obtido aproximadamente 50% de imobilização em 3 horas, usando soluções aquosas de HRP (2000 U.L<sup>-1</sup>). A enzima imobilizada reduziu 30% da cor, e depois de 3 horas, 25% da concentração total de fenol no efluente.

### 3.7 Toxicidade dos efluentes têxteis

As fontes de toxicidade aquática dos efluentes têxteis podem ser difíceis de serem identificadas devido à falta de informações referentes à exata composição ou da toxicidade de muitos corantes e auxiliares químicos conhecidos como contribuintes para a toxicidade aquática dos efluentes têxteis. Dentre alguns agentes pode-se citar: sais, tensoativos, metais, substâncias orgânicas tóxicas, biocidas e ânions tóxicos (ABRAHÃO e SILVA, 2002).

Os efeitos dos azo corantes no organismo humano está sendo estudado há muito tempo. De todas as classes de compostos orgânicos, essa substância foi a mais pesquisada (BROWN e DEVITO, 1993). Muitos dos compostos corantes não apresentam caráter tóxico, mas sua biotransformação é responsável pela formação de compostos com potencialidade carcinogênica e mutagênica (GONÇALVES *et al.*, 1999; VANDEVIVERE *et al.*, 1998).

Segundo Ledakowicz e Gonera (1998), o efluente têxtil pode ocasionar redução de aproximadamente 50% no crescimento microbiano dos lodos ativados, reduzindo consequentemente a degradação dos demais compostos presentes.

Apesar dos corantes não apresentarem toxicidade aguda elevada, a associação desses compostos aos agentes redutores e fixadores, durante o processo de tingimento, faz com que o efluente bruto apresente toxicidade significativa frente aos organismos teste.

Dentre os organismos teste do ensaio de toxicidade aguda, pode-se citar a *Daphnia*, também conhecida como “pulga d’água”, que é um microcrustáceo facilmente encontrado em lagos, represas e lagoas de águas continentais. Mede cerca de 0,5 a 5,0 mm de comprimento (BUIKEMA e SHERBERGER, 1997, citado por ABRAHÃO e SILVA, 2002). A *Daphnia* é um organismo filtrador, alimenta-se de algas, bactérias e detritos orgânicos presentes na água. Seu sistema enzimático é complexo, permitindo portanto a assimilação e a digestão da matéria orgânica sob diferentes formas. A média do ciclo de vida da *Daphnia magna* é de 40 dias a 20°C. No que diz respeito ao teor de oxigênio dissolvido na água, a *Daphnia* é pouco exigente em comparação a outros organismos aquáticos, pois pode viver em meio contendo concentrações mínimas de 15 a 25% de saturação.

Um outro organismo amplamente utilizado para avaliar a toxicidade de efluentes é a *Artemia salina* (Crustácea, Anostraca) que é um microcrustáceo de água salgada, o qual é utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus cistos encontrados facilmente em lojas de aquaristas. O ciclo de vida da *Artemia* se inicia pela eclosão de cistos dormentes, os quais são embriões encapsulados metabolicamente inativos. Esses cistos podem permanecer no estado dormente por muitos anos, desde que mantidos em lugar sem umidade. Quando esses cistos entram em contato com água salgada, eles se tornam hidratados e reassumem o seu desenvolvimento (ABRAHÃO e SILVA, 2002). Nos últimos tempos a *Artemia salina*, tem sido empregada para muitos testes de toxicidade, avaliando-se uma grande variedade de compostos.

Da mesma forma, o uso de plantas superiores em sistemas de testes para monitorar a presença de compostos tóxicos no ambiente aquático está sendo empregado satisfatoriamente. Plantas do gênero *Allium* têm sido utilizadas na avaliação da toxicidade de efluentes e muitos compostos tóxicos e o parâmetro empregado mais comumente para estabelecer a relação entre a concentração e a toxicidade do efluente é a inibição do crescimento de raiz (ARAMBASIC *et al.*, 1995).

No próximo capítulo serão apresentados os equipamentos, reagentes e metodologias utilizados no presente trabalho.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Neste capítulo serão apresentados os reagentes e equipamentos que foram utilizados, e as metodologias empregadas, para se avaliar o potencial da enzima, para descoloração de corantes e efluentes têxteis, como também os organismos utilizados como indicadores de toxicidade.

### **4.1 Local**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Transferência de Massa – LABMASSA - no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

### **4.2 Material**

#### **4.2.1 Corantes**

Para desenvolvimento do trabalho, foram utilizados os corantes reativos Turqueza Remazol G 133%, Preto Remazol B, e o corante ácido Azul Lanaset 2R, cedidos por uma indústria têxtil da região. É grande a importância de se estudar os corantes individualmente devido ao fato dos mesmos estarem presentes no efluente. Os corantes foram utilizados sem nenhum tratamento prévio de purificação.

Na Figura 11 será apresentada a estrutura química dos corantes utilizados para a realização do presente trabalho.



### 4.2.3 Enzima

Foi empregada a enzima *Horseradish* peroxidase (HRP), doada pela TOYOBO DO BRASIL (2005), cujas propriedades são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Propriedades da enzima *Horseradish* peroxidase.

Estabilidade	Estável a -20°C, por um ano
Massa Molecular	Aproximadamente 40,0000 kDa
pH ótimo	6 - 7
Temperatura ótima	45 °C
Estabilidade em pH	5,0 -10,0 (25°C, 20 horas)

**Fonte: TOYOBO DO BRASIL, 2005.**

A enzima peroxidase (HRP III) foi usada em solução aquosa (tampão citrato-fosfato, pH 5,0); antes de cada experimento era centrifugada e o sobrenadante era utilizado. Após a preparação a solução foi armazenada na geladeira à temperatura média de 5°C.

## 4.3 Métodos

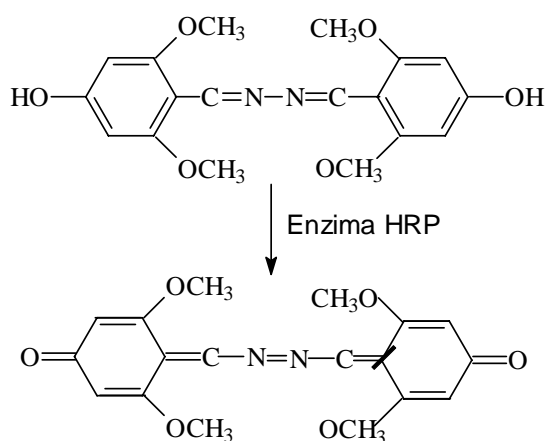
### 4.3.1 Determinação da atividade enzimática da *Horseradish* Peroxidase (HRP-Toyobo do Brasil)

A siringaldazina é substrato para a HRP e é normalmente utilizada para avaliar a atividade enzimática. O produto resultante da reação catalisada pela enzima (peroxidase) absorve na região do visível. Assim a cinética da reação, dada na Figura 13, pode ser acompanhada pela medida do aumento da absorção do sistema em 525 nm, em um espectrofotômetro Shimadzu UV mini –1240, conforme mostrado na Figura 12.





**Figura 12 - Espectrofotômetro Shimadzu UV mini -1240.**



**Figura 13 – Reação da Siringaldazina catalisada pela enzima.**

A determinação da atividade da peroxidase foi feita através do método modificado de Szklarz *et al.* (1989), empregando siringaldazina como substrato enzimático. A mistura da reação foi composta de 0,6 mL de solução enzimática, 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0), 0,1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2,0 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e 0,1 mL de siringaldazina (0,1% em etanol).

A oxidação da siringaldazina até quinona foi acompanhada durante 5 minutos a 525 nm, sendo a atividade expressa em UI/L. Uma unidade de atividade da *Horseradish* peroxidase, foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto e por litro da solução de enzima preparada.

O cálculo da atividade enzimática segue a equação:

$$EnzimaUI / L = \frac{\Delta Abs * 10^6}{\varepsilon * R * T}$$

Onde:

$\Delta Abs$  = Absorbância final – Absorbância inicial.

$\varepsilon$  = Coeficiente de extinção da enzima, dependente do comprimento de onda em que é lida (460 nm = 29400 L/M.cm, 525 nm = 65000 L/M.cm, 610 nm = 4460L/M.cm).

R = Volume em mL, da solução enzimática utilizado, na reação.

T = Tempo de reação.

#### 4.3.2 Determinação do pH

As medidas de pH foram feitas por potenciometria, utilizando um pHmetro Digimed, calibrado com soluções padrões de pH 4,0 e 7,0.



Figura 14 – Medidor de pH Quimis.

### 3.3.3 Determinação da cor pelo método espectrofotométrico.

A análise da cor de uma amostra permite quantificar a presença de compostos que atribuem a esta uma coloração característica, a qual é responsável pelo desvio das características de transparência da amostra padrão (neste caso, a água).

As análises de cor, foram realizadas pelas leituras das absorbâncias nos comprimentos de onda 624 nm (Turqueza), 590 nm (Azul 2R) e 596 nm (Preto B), empregando um espectrofotômetro Shimadzu UV mini -1240 (Figura 12). Em algumas ocasiões foram realizados espectro de varredura, na faixa de comprimento de onda de 200 – 800 nm. Quando necessário foi feita diluição das amostras.

A partir de soluções com diferentes concentrações de corantes, foi construída uma curva padrão Absorbância x Concentração, para determinar a concentração de corantes nas amostras coletadas durante o tratamento enzimático, através dos valores de absorbância lidos em espectrofotômetro.

## 4.4 Testes de Toxicidade

### 4.4.1 Teste de toxicidade aguda com *Artemia salina*

Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados conforme método modificado de Matthews (1995). Cistos de *Artemia salina* foram incubados durante 48 horas em solução de sal marinho sintético ( $30\text{ g L}^{-1}$ ), com aeração e iluminação constantes (1000 lux) e a uma temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ . Após a eclosão, dez larvas do microcrustáceo foram incubadas, em placas de "multiwell", durante 24 horas à  $25^{\circ}\text{C}$ , na ausência de luz, em 2 mL de amostras de corantes e do efluente têxtil bruto e após tratamento enzimático, diluídas em solução de sal marinho sintético ( $30\text{ g L}^{-1}$ ). Os efluentes foram testados em concentrações seriadas (100, 95, 90, 85, 80, 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 10%) para melhor obtenção da  $\text{CL}_{50}$ . Controles negativos foram conduzidos paralelamente usando apenas solução de sal marinho sintético. Após 24 de incubação, foi feita a contagem do número de larvas mortas e a  $\text{CL}_{50}$  foi calculada através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber, usando o software da Burlington Research-INC (HAMILTON *et al.*, 1977, citado por BENASSI, 2004). Para cada concentração testada foram realizadas 4

replicatas com 10 larvas em cada. As larvas eram consideradas mortas se não exibissem nenhum movimento interno ou externo durante 20 segundos de observação.

#### 4.4.2 Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

Os ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna* foram realizados de acordo com as normas da ABNT (NBR 12713: 1993). Antes de analisar a toxicidade do efluente têxtil, antes e posterior ao tratamento enzimático, os microcrustáceos passaram por um teste de sensibilidade usando dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) que tem por objetivo avaliar a qualidade do lote das matrizes. Os testes foram feitos em béqueres de 25 mL, em duplicata para cada concentração, além dos controles com água de diluição. Em cada béquer foram colocados 10 dafnídeos jovens (6-24h de vida). Os efluentes não remediados e remediados com tratamento enzimático foram avaliados em diferentes concentrações. O ensaio foi mantido a uma temperatura de  $20 \pm 2^\circ C$  por 48 horas, em ambiente escuro e sem alimentação. Após 24 e 48h de incubação, os organismos imóveis foram contados e determinado o fator de toxicidade.

#### 4.4.3 Teste de inibição do crescimento de raiz de cebola (*Allium cepa*)

O teste de inibição do crescimento de raiz foi conduzido de acordo com o método de Arambasic *et al.* (1995), com modificações. Bulbos de cebola (18-26g) foram adquiridos comercialmente de supermercados e mantidos em local livre de umidade e ao abrigo da luz. Anteriormente ao teste de toxicidade, os bulbos foram selecionados através de um pré-teste. As raízes velhas foram cuidadosamente removidas e a base dos bulbos foi colocada em copos plásticos (30 mL) contendo água mineral. Após 3 dias de exposição à temperatura de  $25^\circ C$  e na ausência de luz, o crescimento da raiz foi observado. Apenas os bulbos que apresentaram o mesmo padrão de crescimento durante os 3 dias foram selecionados para os testes usando os efluentes. As raízes crescidas durante o pré-teste foram removidas e os bulbos foram reutilizados. Nos testes de inibição de raiz, a base dos bulbos foi colocada em copos plásticos (30 mL) contendo os efluentes não remediados e remediados com a enzima *Horseradish* peroxidase diluídos, em água mineral. Para cada concentração de efluentes (100, 75, 50, 25 e 10%)

foram incubadas 3 cebolas durante 8 dias. A cada 3 dias os efluentes eram trocados e as maiores raízes eram medidas usando um paquímetro. Os ensaios foram realizados em temperatura ambiente e no escuro, usando como controle negativo cebolas expostas apenas em água mineral, e como controle positivo cebolas expostas em uma solução de sulfato de cobre (1 mg/L).

#### 4.5 Estudo cinético da degradação enzimática de corantes isolados e do efluente têxtil.

Os experimentos para avaliar a degradação de corantes em fase aquosa, pela enzima *Horseradish* peroxidase na forma livre, foram conduzidos à temperatura ambiente (25°C), e foram variados parâmetros como pH, concentração de enzima (HRP), concentração de corante, quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e temperatura, a fim de determinar as condições ótimas para remoção do corante e tempo de contato, conforme procedimento descrito por Mohan *et al.* (2005).

Inicialmente foram feitos experimentos com o corante Turqueza Remazol G 133%, isoladamente para determinar as condições ótimas para a descoloração. Foi realizada uma série de experimentos, variando o pH (2–9), concentração de corantes (10–100 mg/L), quantidade de peróxido (de  $1 \times 10^{-3}$  mmol L<sup>-1</sup> –  $1,2 \times 10^{-2}$  mmol L<sup>-1</sup>), quantidade de enzima (2,985–29,85 U/mL) e temperatura (20, 30, 40°C). Para a correção do pH, foi utilizado ácido cítrico, o mesmo empregado para a preparação do tampão citrato – fosfato. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Para o acompanhamento da cinética de descoloração, foi utilizado um espectrofotômetro Shimadzu UV mini -1240. As leituras de absorbância foram feitas para o corante no comprimento de onda 624 nm para o Turqueza Remazol G 133%, 590 nm para o Azul Lanaset 2R e 596 nm para o Preto Remazol B.

O cálculo para determinar a porcentagem de remoção de cor para os corantes foi feito de acordo com a equação:

$$\frac{Abs_{inicial} - Abs_{final}}{Abs_{inicial}} * 100$$

Para avaliar a descoloração do efluente têxtil, em um erlenmeyer, contendo 100 mL de efluente têxtil filtrado, a pH 4,0, foram adicionados 0,5mL de enzima (29,85 U/mL) e  $2 \times 10^{-3}$  mmol L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio (100 µL). Para o efluente têxtil, a descoloração foi avaliada em temperaturas de 20, 30 e 40°C. A cada 10 minutos, uma

alíquota era retirada, e feita a leitura da absorbância no espectrofotômetro Shimadzu UV mini -1240.

A quantificação da cor do efluente têxtil foi realizada a partir do valor da área abaixo da curva, obtida mediante uma varredura espectral na faixa 300–700 nm. A avaliação da descoloração foi feita através da diferença entre a área inicial e a área final.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, apresentam-se os resultados obtidos no estudo de descoloração de corantes e efluentes têxteis, utilizando a enzima *Horseradish* peroxidase na forma livre.

Em um primeiro momento, com o objetivo de determinar as melhores condições de atuação da enzima, foi feito um estudo detalhado do corante Turqueza Remazol G 133%, onde os parâmetros como pH, quantidade de enzima e  $H_2O_2$ , concentração de corante e temperatura foram avaliados. Os resultados desse estudo foram utilizados, para avaliar a descoloração do corante Preto Remazol B, Azul Lanaset 2R e do efluente têxtil.

Foi também avaliada a toxicidade aguda dos corantes e do efluente têxtil, utilizando como bioindicadores os microcrustáceos, *Artemia salina*, *Daphnia magna* e inibição do crescimento da raiz da cebola (*Allium cepa*).

### 5.1 Tratamento enzimático de corantes têxteis.

Os corantes comerciais apresentam uma grande variedade de cores e estruturas, contendo substituintes nitro, grupos sulfônico, grupamentos  $N=N$ , etc. Esta diferença estrutural faz com que a enzima atue de forma diferente, tanto com relação à capacidade de remoção, quanto com relação às velocidades de degradação. Na reação enzimática com corantes, a porcentagem de descoloração e a taxa de degradação procederam-se com cinéticas diferentes, variando com o corante em estudo.

Neste trabalho foi avaliada a especificidade da HRP para os diferentes corantes: Turqueza Remazol G 133%, Azul Lanaset 2R e Preto Remazol B. Foi obtido o pH ótimo para degradação de corantes, determinados os fatores que inibiam a atividade da enzima, as constantes cinéticas da degradação dos corantes selecionados e a inativação da HRP na presença de corante e  $H_2O_2$ , conforme estudado por Bhunia *et al.* (2002).

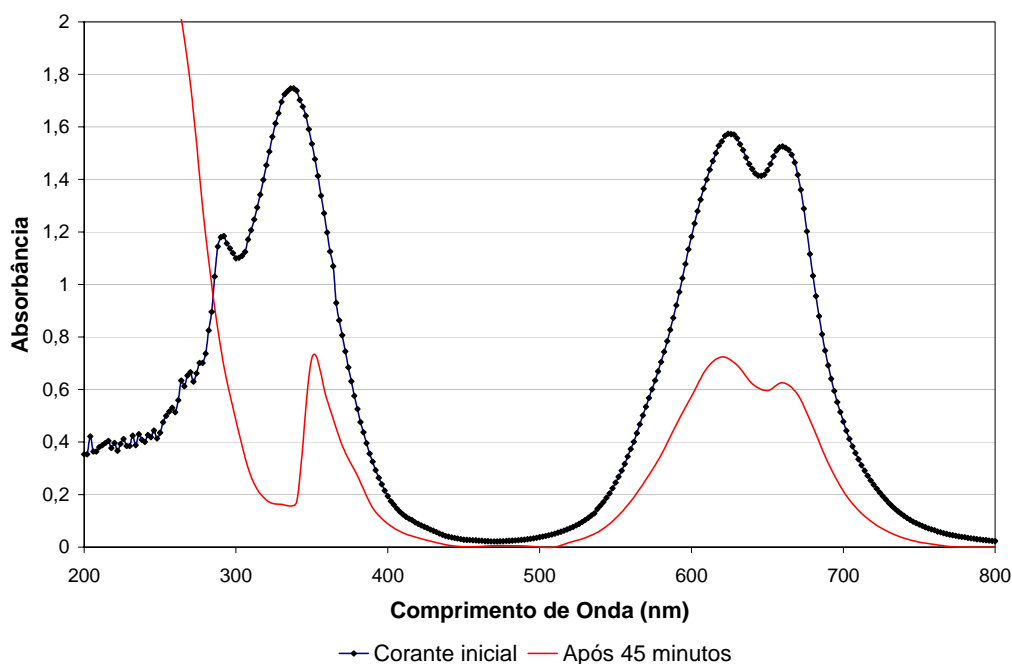
A degradação dos corantes foi avaliada através dos espectros de absorbância UV-Vis, que mostram a eficiência do processo utilizado para o tratamento dos corantes.

### 5.1.1 Degradação Enzimática do Corante Turqueza Remazol G 133%

O corante Turqueza Remazol G 133% é muito utilizado pelas indústrias têxteis. É pertencente à classe de corantes reativos, apresenta um grupo monofuncional e como grupo reativo a vinilsulfona.

Inicialmente foi realizada uma avaliação deste corante nas seguintes condições: concentração de corante de 100 mg/L,  $5 \times 10^{-3}$  mL de enzima/ mL de solução (29,85 U/mL), pH entre 4,0 e 5,0, temperatura 30°C, e como, a peroxidase é dependente de peróxido de hidrogênio foi utilizado  $2 \times 10^{-3}$  mmol L<sup>-1</sup> (100µL) do mesmo.

Na Figura 15 são apresentados os espectros do corante Turqueza, antes e depois do tratamento enzimático (29,85 U/mL), podendo verificar que os picos da absorbância se encontram na região do visível, considerando que os picos na faixa de 300 – 400 nm ficam próximos à região UV. Foi considerado para avaliar a remoção de corante os picos na região entre 550 – 700 nm.



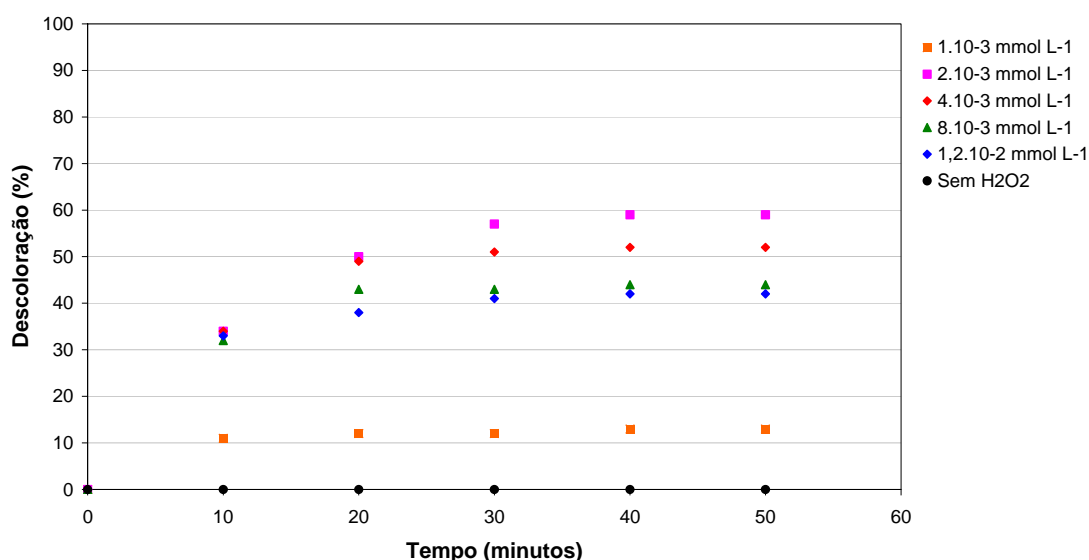
**Figura 15 - Espectro de varredura do corante Turqueza, antes e após o tratamento com a enzima HRP livre.**

Resultados iniciais, obtidos com o corante Turqueza Remazol G 133%, mostram que houve uma descoloração de 59%, como pode ser observado através da redução das absorbância no comprimentos de onda, 624 nm.



Uma vez que a peroxidase é totalmente dependente do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a dosagem do mesmo é um dos parâmetros que deve ser otimizado para garantir a eficiência da técnica, uma vez que em excesso inibe a atividade da peroxidase e quando em pequena quantidade limita a taxa de reação.

Para verificar este efeito, foi feito um estudo variando-se a quantidade de peróxido adicionada ( $1 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$  –  $1,2 \times 10^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$ ), a concentração de corante utilizada foi 100 mg/L, temperatura 30°C,  $5 \times 10^{-3} \text{ mL}$  de enzima/ mL de solução corante em estudo (29,85 U/mL). Os ensaios foram realizados em triplicata, a cada 10 minutos uma alíquota era retirada e feita à leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda 624 nm. Os resultados são apresentados na Figura 16.

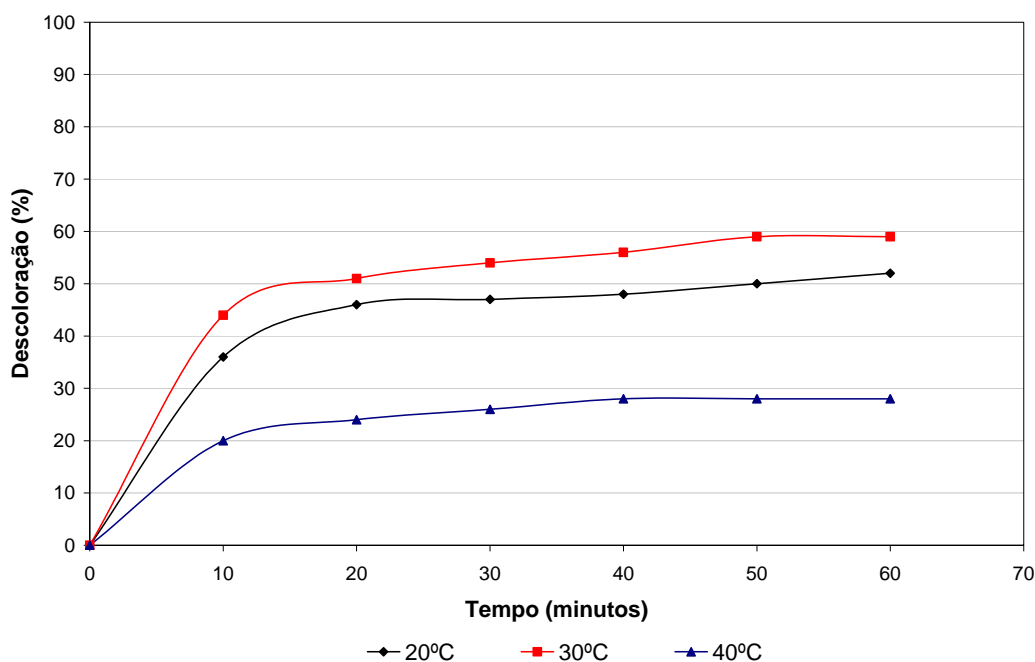


**Figura 16 - Efeito da quantidade de peróxido de hidrogênio, na descoloração do corante Turqueza G 133%, pela enzima HRP.**

Conforme ilustrado na Figura 16, pode-se avaliar o efeito da quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na descoloração do corante têxtil. Em um primeiro momento verifica-se que na ausência de  $\text{H}_2\text{O}_2$  não existiu descoloração do corante, uma vez que a atividade da HRP é absolutamente dependente da presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Quando foi adicionado  $2 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$ , obteve-se uma descoloração de 59%, sendo este o melhor resultado obtido quando comparado às outras quantidades utilizadas. O aumento na quantidade de peróxido passou a ter um efeito inibitório, diminuindo a eficiência na remoção de cor, confirmando as observações de Peralta-Zamora (1998). No entanto, se fosse observado

qualquer índice de descoloração na ausência desse coadjuvante, seria responsabilidade de processos não enzimáticos, possivelmente adsorção dos substratos.

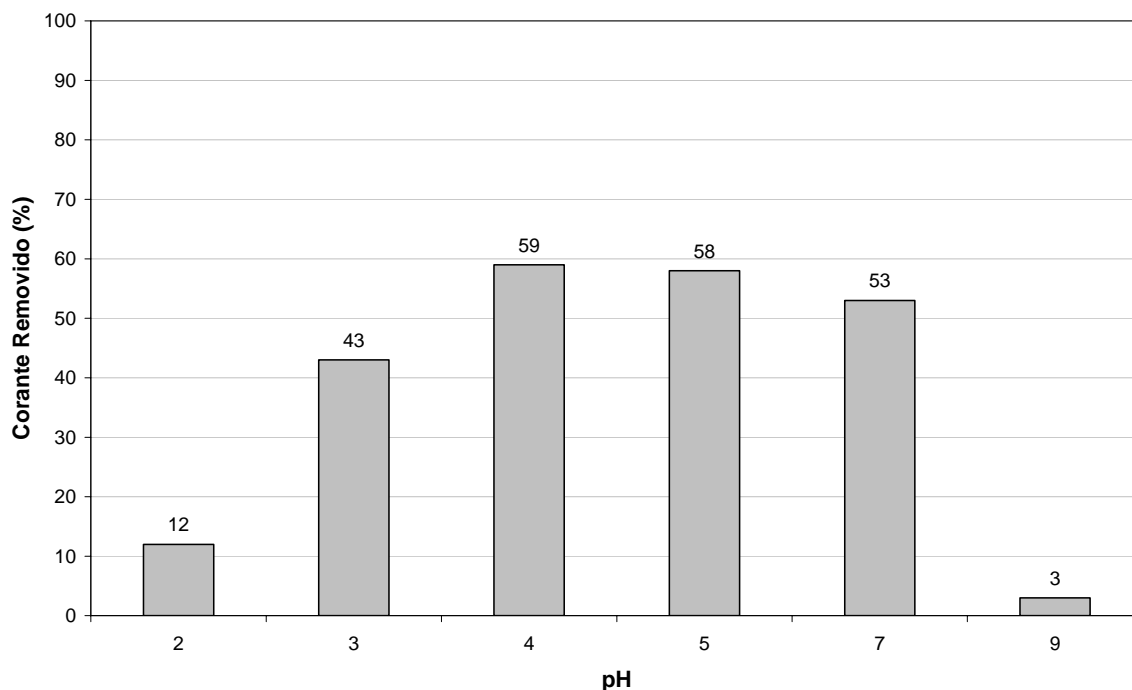
A atividade da enzima depende da temperatura; conforme esta é elevada, a taxa de reação se torna maior. No entanto, a temperaturas elevadas, ocorre a desnaturação da proteína, evidenciada pela perda de atividade da enzima no meio. No Figura 17 ilustra o efeito da temperatura na descoloração do corante Turqueza Remazol G 133%, pela enzima *Horseradish* peroxidase na forma livre. No ensaio foi avaliado a atuação da enzima na solução do corante Turqueza Remazol g 133%, em 20, 30 e 40°C, concentração de corante de 100 mg/L,  $5 \times 10^{-3}$  mL de enzima/ mL de solução corante em estudo (29,85 U/mL) e  $2 \times 10^{-3}$  mmol L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio e pH na faixa de 4,0-5,0.



**Figura 17 - Influência da temperatura na descoloração do corante Turqueza Remazol G 133%, pela enzima HRP livre.**

A temperatura na qual foi obtida a maior descoloração foi de 30°C (59%), seguida pela de 20°C, com 52%. Para a temperatura de 40°C, houve apenas 28% de descoloração, confirmando que para altas temperaturas ocorre uma diminuição de sua atividade e eficiência. Este estudo mostrou o comportamento da enzima HRP em diferentes temperaturas, frente aos corantes estudados.

Para se melhorar a eficiência do processo, é importante analisar o efeito do pH da solução em estudo, pois a enzima passa a ter uma melhor atuação no seu pH ótimo. Foram realizados estudos de otimização com o corante Turqueza G 133% variando o pH da fase aquosa da mistura de reação entre 2,0 e 9,0, concentração de corante de 100 mg/L,  $5 \times 10^{-3}$  mL de enzima/ mL de solução corante em estudo (29,85 U/mL) e  $2 \times 10^{-3}$  mmol L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio. A variação da remoção de corante em diferentes valores de pH pode ser observada na Figura 18.



**Figura 18 - Efeito do pH sobre a ação da HRP, na remoção de cor.**

A partir dos resultados obtidos, é possível avaliar o efeito do pH na atuação da enzima para a descoloração do corante têxtil. Pode-se observar que a melhor atuação da mesma foi em pH igual a 4,0. No entanto, mesmo que tenha se alcançado 59% de descoloração do corante no pH 4,0, esse resultado não foi muito alterado entre pH 4,0 a 5,0, apresentando assim a faixa de melhor atuação da enzima. Para os valores de pH 2,0 e 9,0, os resultados foram muito baixos quando comparado aos demais.

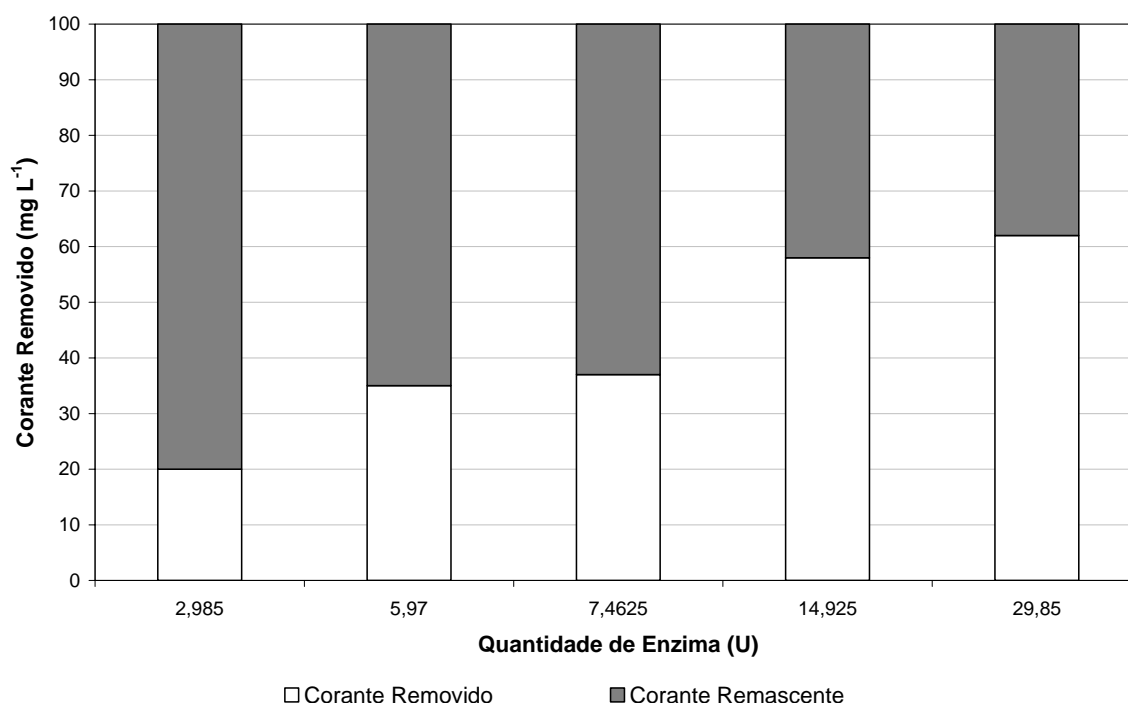
Segundo o estudo de Mohan *et al.* (2005), em pH 2,0, foi obtido 68% de remoção do corante ácido Black 10 BX, catalisado pela enzima HRP na forma livre. Com aumento do pH, acima de 2,0, a remoção do corante encontrada teve uma queda significativa até 7,0, permanecendo igual até pH 9,0. Bhunia *et al.* (2002) avaliaram a degradação enzimática do corante Azul Remazol e Vermelho Cibacron em diferentes

pH. Em pH 6,0, as taxas de degradação enzimática foram muito baixas, mas aumentaram com a redução do pH. Estes estudos mostraram que o pH ideal pode variar para a mesma enzima, justificando assim a necessidade da avaliação do pH a ser utilizado.

Normalmente a remoção do composto aromático é dependente da quantidade de enzima adicionada, considerando que o catalisador e também a conversão sejam dependentes do tempo de contato. Uma relação ótima entre a quantidade de enzima e de substrato pode alcançar uma máxima atividade.

Desta maneira foi estudada a quantidade ótima de enzima a ser utilizada, que irá influenciar significativamente na velocidade de reação e na quantidade de corante removido. Na Figura 19 é apresentada a concentração de corante removido (mg/L), em função da quantidade de enzima utilizada.

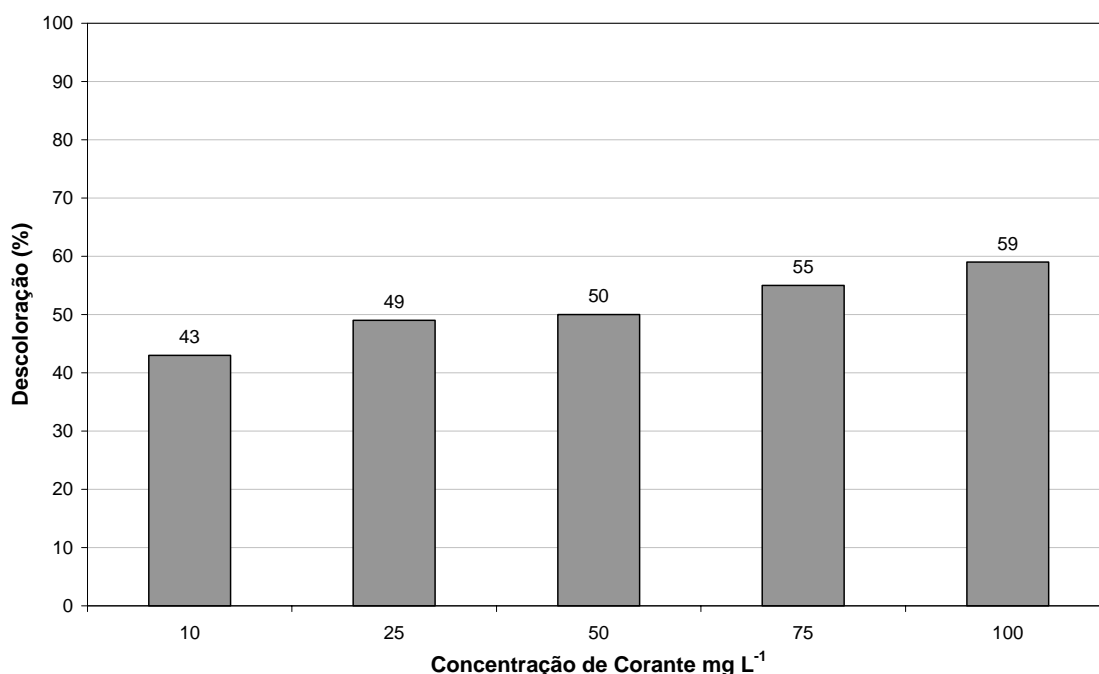
Foram estudadas diversas unidade de atividade de enzima, variando de 2,985 U/mL até 29,85 U/mL. A concentração do corante foi de 100 mg/L, pH 5,0 e temperatura 30 °C e quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de  $2 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$ . Para se calcular a concentração de corante removida e de remanescente, foi utilizada a equação da reta obtida pela curva de calibração do corante.



**Figura 19 - Efeito da quantidade de enzima HRP livre, na remoção de corante.**

A concentração de corante removido foi dependente da unidade de enzima utilizada. Para a quantidade de enzima igual a 14,985 U, houve uma remoção de 58%, dobrando essa quantidade a remoção foi de 62% (29,85U). Conclui-se então, que mesmo saturando a solução de corante com a enzima, a quantidade de corante removido não é influenciada significativamente.

A quantidade de substrato influencia também na atividade da enzima, e na eficiência do processo. Foi avaliada a atuação da enzima em diferentes concentrações de corante (10 a 100mg/L), conforme apresentado na Figura 20. Os ensaios foram conduzidos a temperatura de 30°C,  $5 \times 10^{-3}$  mL de enzima/ mL de solução de corante (29,85 U/mL),  $2 \times 10^{-3}$  mmol L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio e pH 4,0.



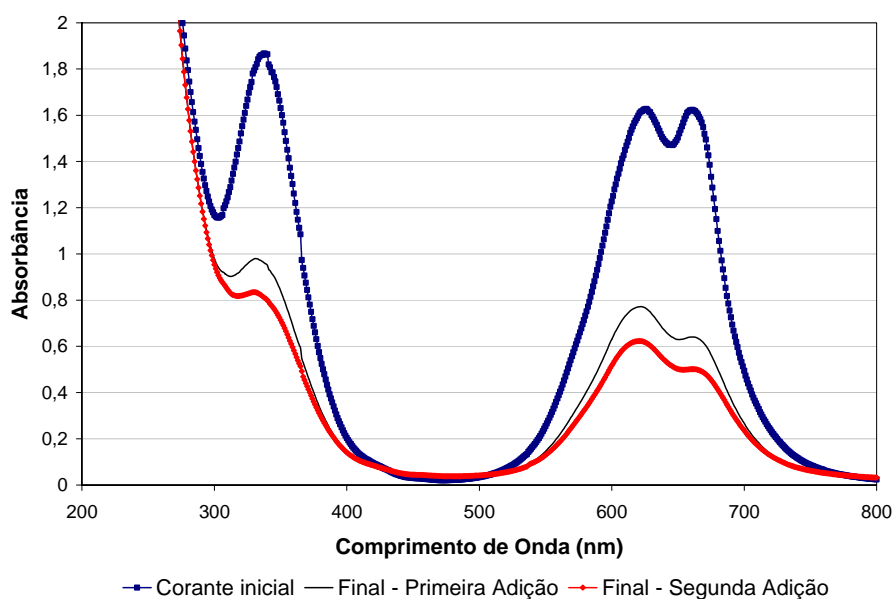
**Figura 20 - Efeito da concentração de corante na solução catalisada pela HRP.**

Foi observada uma maior descoloração foi obtida em uma concentração de corante (100 mg/L). Não foram realizados ensaios para este corante com uma concentração acima de 100 mg/L.

Tal comportamento é apresentado por Mohan *et al.* (2005), que demonstraram que a concentração de substrato presente na fase aquosa influencia significativamente a reação mediada pela enzima. Se a concentração de enzima é mantida constante, e a concentração de substrato é aumentada gradualmente, a velocidade de reação aumentará, até chegar ao valor máximo. Depois de alcançar o equilíbrio qualquer adição de substrato não vai mudar a taxa de reação.

Em muitos casos a quantidade de catalisador adicionada pode não ser suficiente para completar a reação.

Na Figura 21 são apresentados os resultados de dois experimentos de degradação enzimática. Na primeira adição foi utilizado  $5 \times 10^{-3}$  mL de enzima/ mL de solução corante em estudo (29,85 U/mL); na segunda adição esse, valor foi dobrado. Os outros parâmetros foram mantidos constantes (concentração de corante 100 mg/L, pH 4,0,  $2 \times 10^{-3}$  mmol L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio e temperatura de 30°C).



**Figura 21 – Descoloração do corante Turqueza G 133%, com diferentes quantidades de enzima.**

Mesmo trabalhando com condições de saturação, o aumento da quantidade de enzima adicionada não apresentou influencia significativa na velocidade de reação, e também na descoloração do corante. Adicionando  $5 \times 10^{-3}$  mL de enzima/ mL de solução corante em estudo, obteve-se 59% de descoloração; dobrando essa quantidade de enzima adicionada, o valor obtido foi de 62%, em um mesmo tempo de reação.

### 5.1.2 Avaliação da toxicidade aguda do corante Turqueza Remazol G 133%.

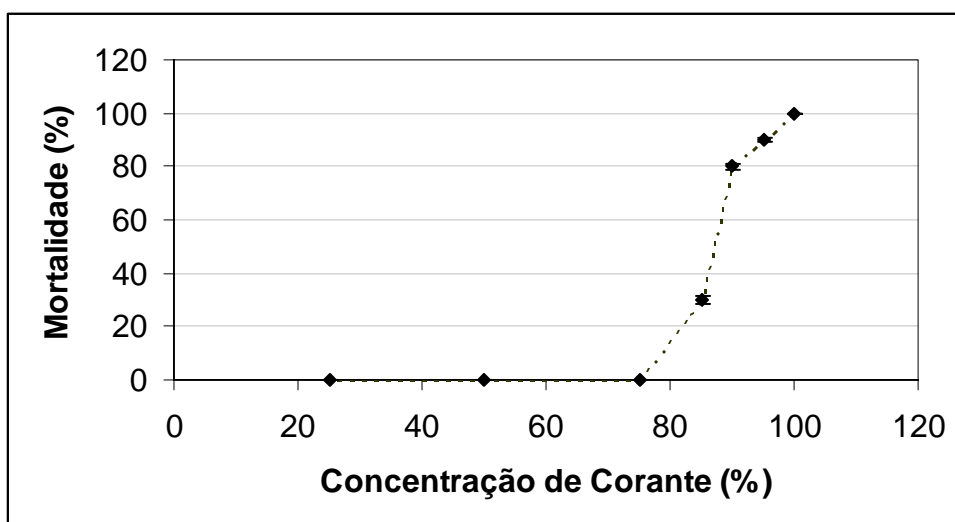
A toxicidade é uma propriedade inerente ao agente químico que produz efeitos danosos a um organismo quando este é exposto, por um período de tempo, a determinadas concentrações daquele agente. Os testes de toxicidade avaliam o efeito do

corante como um todo, ou através de substâncias específicas que o compõe; estas abordagens permitem avaliar os efeitos aditivos, antagônicos e sinérgicos dos agentes tóxicos.

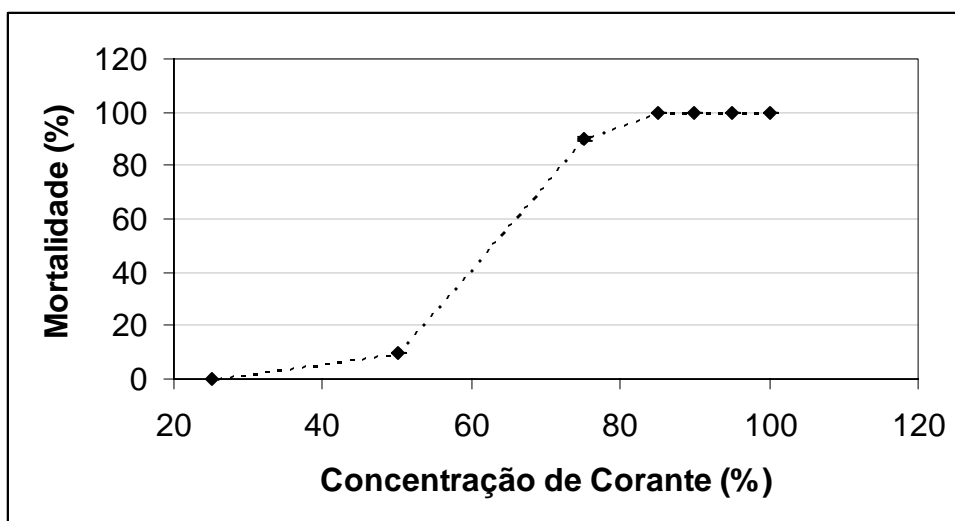
Não somente os corantes, mas muitos outros produtos auxiliares do processo têxtil, podem ser responsáveis por efeitos tóxicos. O conteúdo de metais pesados em corantes tem merecido muitos estudos, contudo a prática de se evitar o uso desse tipo de corante é eminente, através da substituição de tais produtos. Desta forma, foi avaliada a toxicidade aguda do corante Turqueza Remazol G 133% bruto e após o tratamento enzimático, cujos resultados são apresentados Tabela 5 e nas Figuras 22 e 23. Os testes foram realizados em quadruplicata e os resultados são apresentados como média  $\pm$ EPM (n=10). Inicialmente havia 10 larvas, conforme descrito no item 3.4.1, do capítulo 3 deste trabalho.

**Tabela 5: Testes de Toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia salina*, após 24 horas de incubação em diferentes concentrações de corante.**

Concentração (%)	Corante não tratado Mortalidade (%)	Corante Tratado Mortalidade (%)
100	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
95	80 $\pm$ 0,577	100 $\pm$ 0
90	70 $\pm$ 1,1547	100 $\pm$ 0
85	30 $\pm$ 1,732	100 $\pm$ 0
75	0 $\pm$ 0	90 $\pm$ 0,577
50	0 $\pm$ 0	10 $\pm$ 0
25	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0



**Figura 22 - Teste de toxicidade aguda para o microcrustáceo *Artemia salina* após 24 horas de exposição em diferentes concentrações de corante não tratado.**



**Figura 23 - Teste de toxicidade aguda para o microcrustáceo *Artemia salina* após 24 horas de exposição em diferentes concentrações de corante tratado com a enzima HRP.**

A partir dos resultados obtidos da toxicidade aguda do corante Turqueza, utilizando o microcrustáceo *Artemia salina*, após 24 horas de exposição, foi calculada a  $CL_{50}$  utilizando o método matemático Trimmed Spearman-Kärber. O corante Turqueza bruto apresentou uma baixa toxicidade ( $CL_{50} = 87,5\%$ ); no entanto após o tratamento enzimático, a toxicidade foi mais elevada ( $CL_{50} = 60,70\%$ ), causando expressiva mortalidade dos microcrustáceos.

Em estudo realizado por Gottlieb *et al.* (2003), foi verificado o aumento da toxicidade quando houve descoloração do corante preto reativo hidrolisado em condições anaeróbicas, utilizando a bactéria bioluminescente *Vibrio fischeri* como



indicador, sendo que o mesmo efeito não foi observado quando foi utilizado biorreator aeróbio.

No caso do corante reativo R-21, quando submetido a tratamento com ozônio, sua toxicidade aumentou sensivelmente. Suspeitou-se então que esta toxicidade fosse devido à molécula de cobre que estaria sendo liberada da estrutura do corante com a oxidação deste (KUNZ, 1999). O metal inicialmente complexado ao corante não estaria biodisponível, ou seja, não estaria presente num estado livre em condições a ser assimilado pela bactéria *Vibrio fischeri*, ao passo que após a ozonização sua biodisponibilidade seria aumentada, contribuindo para o aumento da toxicidade.

Tais trabalhos confirmam a possibilidade de um aumento na toxicidade do efluente após um determinado tratamento, independente da sua natureza (biológico ou químico).

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados do teste de inibição do crescimento da raiz da cebola, nas concentrações (100, 50, 25, 10%), de corante bruto e após o tratamento enzimático. Foi utilizado como controle negativo água mineral e como positivo sulfato de cobre (0,1 g/L). O tempo de exposição foi de 8 dias em local escuro.

**Tabela 6 - Inibição do crescimento da raiz de cebola (*Allium cepa*), exposta a 8 dias em diferentes concentrações de corante bruto e após tratamento enzimático.**

Amostra	Crescimento médio (cm)	Inibição do crescimento (%)
Controle negativo	9,5±0,5	0,00%
Controle positivo	0	100%
Corante não tratado 100%	2,5±1,5	73,68
Corante não tratado 50%	3,25±2,25	65,78
Corante não tratado 25%	3,5±2,0	63,15
<b>Corante não tratado 10%</b>	<b>5,0±0,5</b>	<b>47,36</b>
Corante tratado 100%	1,0±0	89,48
Corante tratado 50%	1,5±1,0	84,21
Corante tratado 25%	1,75±1,75	81,57
<b>Corante tratado 10%</b>	<b>3,85±0,15</b>	<b>59,47</b>

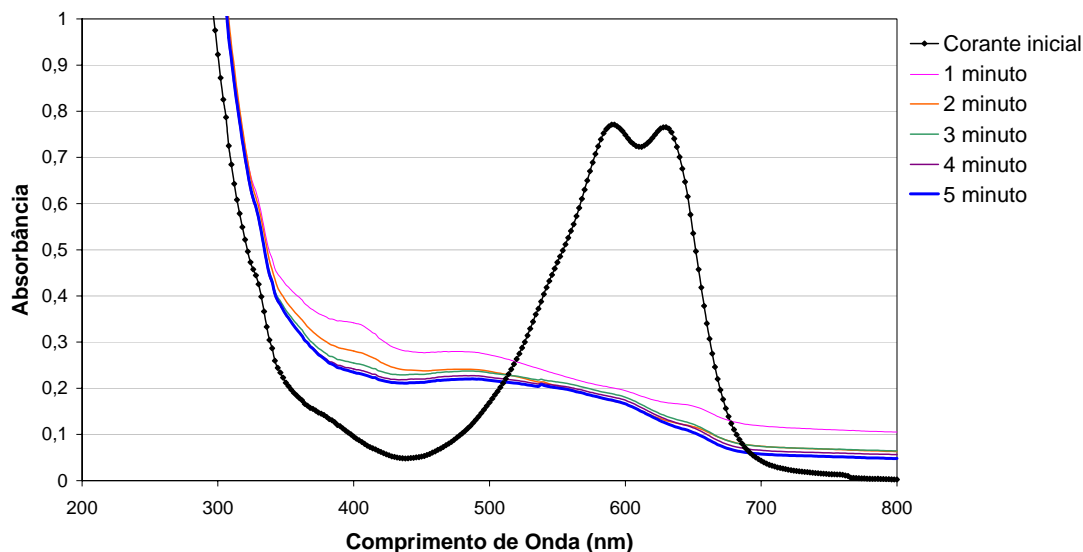
Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 6 pode-se afirmar que houve uma inibição de crescimento 12% maior do corante após o tratamento com a enzima HRP, comparativamente ao corante sem tratamento, levando em consideração a menor concentração estudada.

Mesmo os resultados obtidos para o bulbo da cebola indicando um aumento da toxicidade do corante após o tratamento enzimático, seriam necessários ensaios mais específicos como fragmentação do DNA, micronúcleos e ensaios bioquímicos para confirmar ou não estes dados.

Os resultados obtidos nos experimentos iniciais, para a determinação das condições ótimas de atuação da enzima, foram concentração de corante 100 mg/L, pH entre 4,0 e 5,0, quantidade de enzima  $5 \times 10^3$  mL/mL solução (29,85 U/mL), quantidade de peróxido 0,1 mL (2mM)/ 100mL de solução de corante em estudo, e temperatura de 30°C. Os demais resultados apresentados neste trabalho com o corante Azul Lanaset 2R, Preto Remazol B e também para o efluente têxtil, foram realizados utilizando estes parâmetros experimentais ótimos.

### 5.1.3 Degradação Enzimática do Corante Azul Lanaset 2R

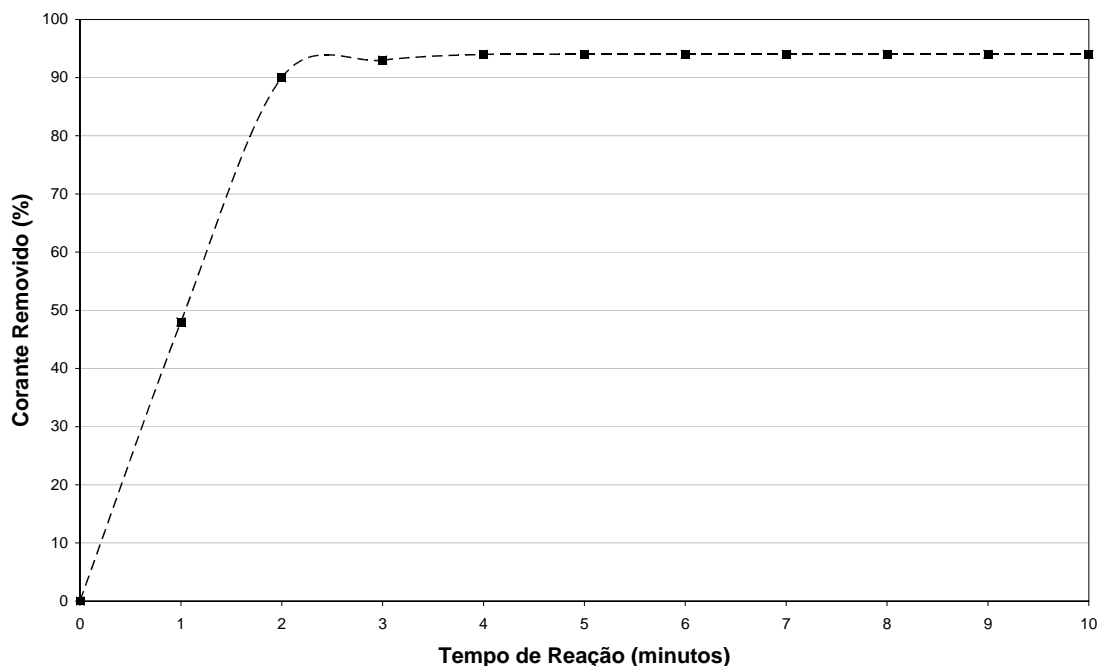
Na Figura 24, é apresentado o espectro obtido para o corante Azul Lanaset 2R (antraquinona), para os primeiros 5 minutos de descoloração com a enzima HRP. Os ensaios foram conduzidos a temperatura de 30°C,  $5 \times 10^{-3}$  mL de enzima/ mL de solução corante em estudo (29,85 U/mL), concentração de corante de 100 mg/L,  $2 \times 10^{-3}$  mmolL<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio e pH 4,0.



**Figura 24 – Descoloração do Corante Azul 2R, pela enzima HRP.**

Conforme pode ser observado na Figura 24 o corante Azul 2R apresentou uma rápida cinética de degradação. Ao iniciar a degradação enzimática para o corante têxtil, observou-se logo nos primeiros minutos da reação uma mudança na cor da solução. Inicialmente o corante tinha cor azul e logo após os primeiros minutos de reação passou para uma coloração rosa clara, permanecendo desta maneira, sem formação de um novo pico, até o fim da corrida. O mesmo aconteceu em todas as repetições. Observou-se uma descoloração de 94%, quando medida a absorbância em 590 nm.

Na Figura 25 são apresentados os resultados de descoloração do corante Azul Lanaset 2R em função do tempo de reação, o ensaio foi conduzido nas mesmas condições apresentados na Figura 24. Alíquotas foram retiradas a cada 1 minuto, centrifugadas e lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda 590 nm.

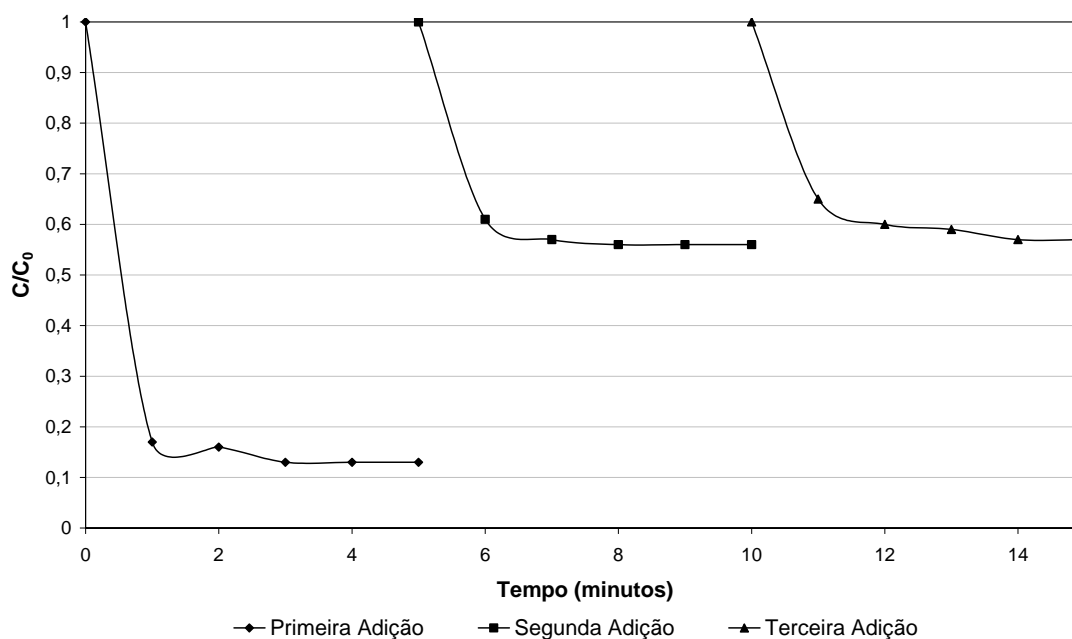


**Figura 25 - Porcentagem de descoloração, em função do tempo de contato com a enzima (HRP).**

Para o corante Azul Lanaset 2R, observou-se que foi obtido 94% de descoloração em 5 minutos; entretanto em 10 minutos não houve nenhuma mudança nos valores de absorbância.

O corante Azul 2R apresentou uma cinética de descoloração rápida, quando comparado com o Turqueza Remazol G 133%.

Com o intuito de avaliar se a enzima permanecia ativa na solução, foram feitas adições de substrato, conforme apresentado na Figura 26, os resultados indicam uma diminuição da eficiência da enzima na segunda adição. Porém, após a terceira adição, verificou-se um aumento exagerado na turbidez da solução, inviabilizando as leituras espectrofométricas.



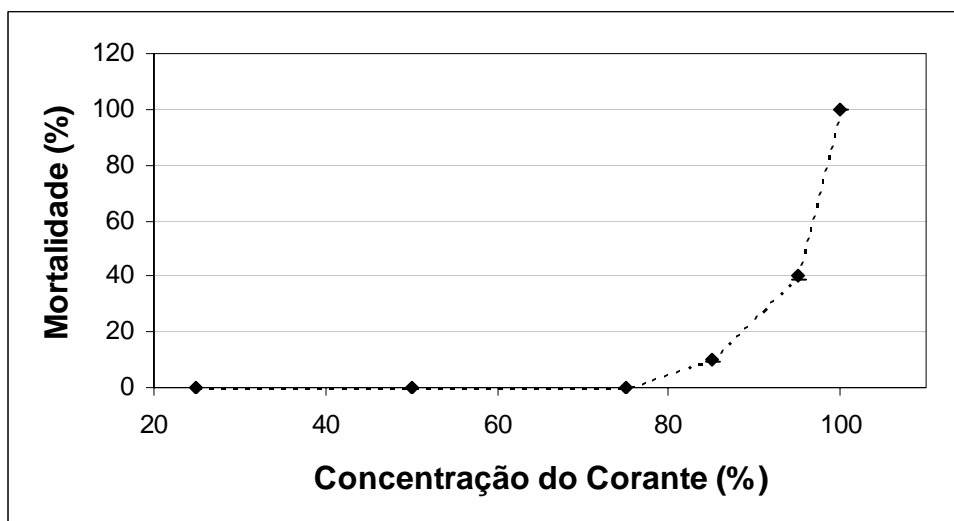
**Figura 26 - Cinética de descoloração do Corante Azul 2R, em função do tempo e adição do substrato.**

#### 5.1.4 Avaliação da Toxicidade aguda do corante Azul Lanaset 2R.

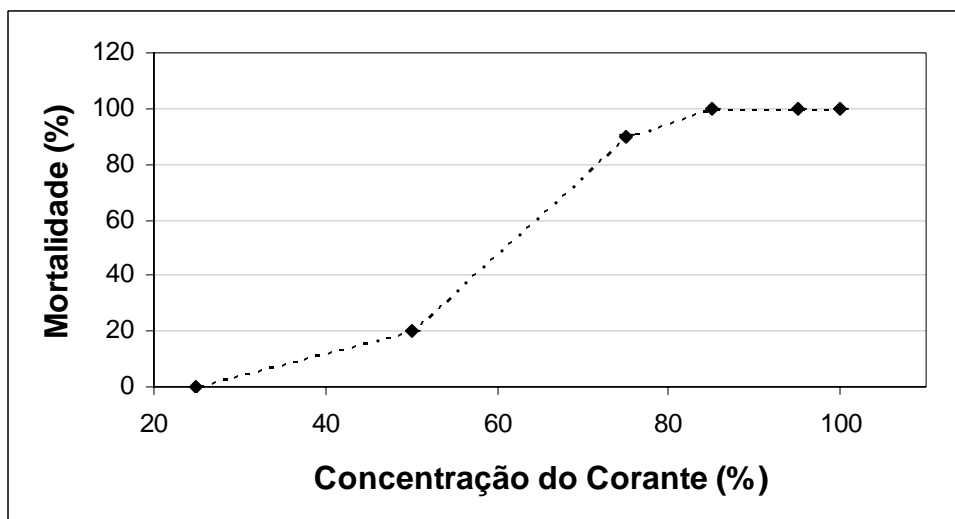
Foi avaliada a toxicidade aguda do corante ácido Azul Lanaset 2R, antes e após o tratamento enzimático, usando o microcrustáceo *Artemia salina*, conforme descrito no item 3.4.1, do capítulo 3 deste trabalho, com o objetivo de verificar se o processo utilizado para degradar os corantes estava produzindo espécies intermediárias mais tóxicas que o composto de partida. Nas Figuras 27 e 28 e na Tabela 7 é apresentado o número de organismos mortos após 24 horas de incubação, com o corante Azul 2R antes e após o tratamento enzimático, respectivamente.

**Tabela 7: Testes de Toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia salina*, após 24 horas de incubação em diferentes concentrações de corante.**

Concentração do corante (%)	Corante não tratado Mortalidade (%)	Corante tratado Mortalidade (%)
100	100±00	100±0
95	40±0,8819	100±0
85	10±0,3333	100±0
75	0±0	90±0,5773
50	0±0	20±0,25
25	0±0	0±0



**Figura 27 – Teste de toxicidade aguda para o microcrustáceo *Artemia Salina*, após 24 horas de exposição em diferentes concentrações do corante Azul 2R antes do tratamento.**



**Figura 28 – Teste de toxicidade aguda para o microcrustáceo *Artemia Salina*, após 24 horas de exposição em diferentes concentrações do corante Azul 2R após o tratamento enzimático.**

Os resultados da concentração letal média ( $CL_{50\%}$ ), capaz de matar 50% das larvas expostas em 24 horas, para o corante Azul Lanaset 2R antes do tratamento foi 95,86% e, após o tratamento enzimático, foi de 60,71%. Pode-se concluir que a toxicidade aguda apresentou-se mais elevada para o corante após ter sido submetido ao tratamento enzimático.

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados do teste de inibição do crescimento da raiz de cebola para o corante Azul Lanaset 2R. Para o controle positivo foi utilizada água mineral e para o negativo, sulfato de cobre (0,1g/L).

**Tabela 8 - Inibição do crescimento da raiz de cebola (*Allium cepa*), exposta a 8 dias em diferentes concentrações de corante bruto e após tratamento enzimático.**

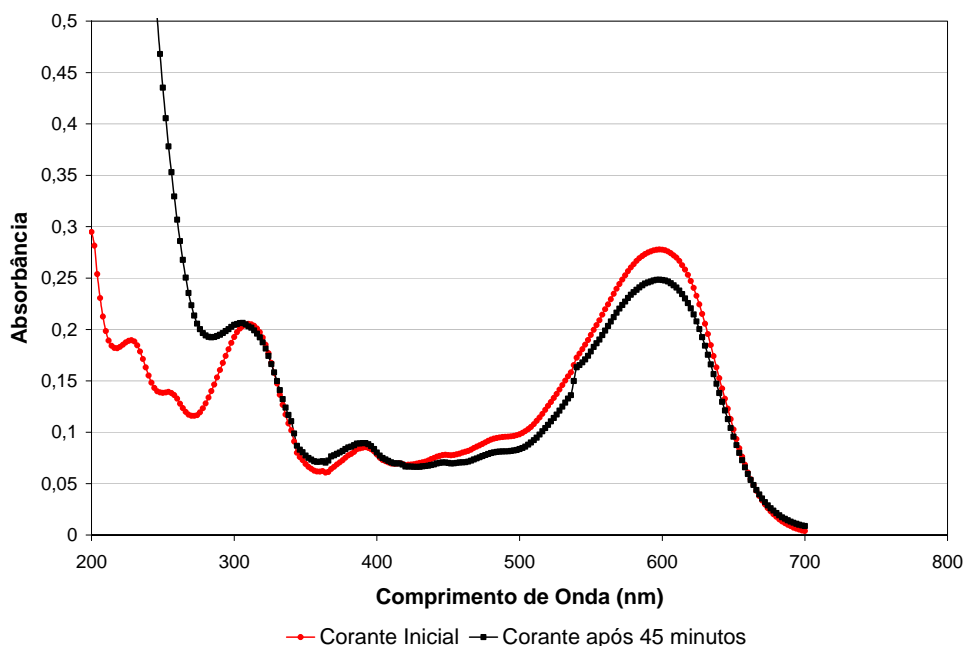
<b>Amostra</b>	<b>Crescimento médio (cm)</b>	<b>Inibição do crescimento (%)</b>
Controle negativo	9,5±0,5	0,00%
Controle positivo	0	100%
Corante não tratado 100%	0	100
Corante não tratado 50%	0	100
Corante não tratado 25%	1,0±0	89,48
<b>Corante não tratado 10%</b>	<b>2,3±0,7</b>	<b>75,78</b>
Corante tratado 100%	0	100
Corante tratado 50%	0	100
Corante tratado 25%	0,5±0	94,73
<b>Corante tratado 10%</b>	<b>1,0±0</b>	<b>89,48</b>

Os resultados dos testes de inibição do crescimento da raiz de cebola confirmaram os resultados anteriormente obtidos com a *Artemia* salina, onde a toxicidade foi mais elevada no corante após o tratamento enzimático. Mesmo na concentração de corante estudada (10%), a inibição do crescimento da raiz de cebola foi 14% maior após o tratamento com a enzima HRP, comparativamente ao corante não tratado.

#### **5.1.5 Degradação Enzimática do Corante Preto Remazol B**

O corante Preto Remazol B, é pertencente à classe de corantes reativos, possui como grupo funcional bi(poli)funcional, e como grupo reativo a Vinilsulfona. Diferente dos outros dois corantes estudados, este não apresentou uma descoloração superior a 10%, devido ao fato de ele possuir recalcitrância maior que os demais, conforme demonstrado na Figura 29. Os ensaios com o corante preto remazol B, foram realizados nas mesmas condições dos dois corantes estudados anteriormente.



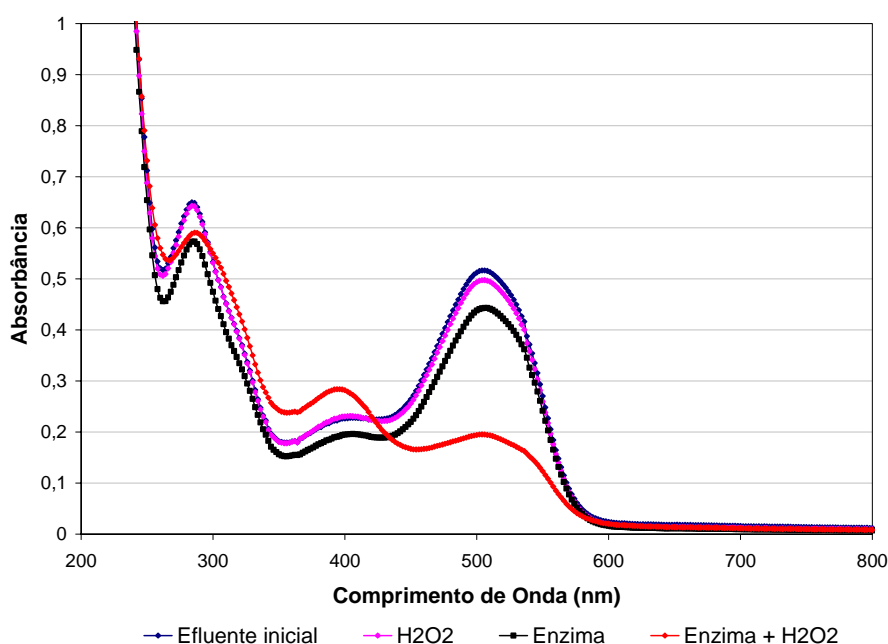


**Figura 29 - Espectro de varredura do corante Preto Remazol B, antes e após 45 minutos de tratamento com a enzima HRP.**

## 5.2 Degradação enzimática de efluentes têxteis

As águas residuárias têxteis caracterizam-se por possuir uma cor bastante acentuada, uma vez que cerca de 40% do corante inicial não é fixado a fibra durante o processo de tingimento, sendo por isso liberado para os efluentes. Estes, quando lançados ao meio ambiente sem nenhum tratamento, podem causar sérios problemas de contaminação ambiental, diminuindo a transparência da água e, consequentemente, impedem a penetração da radiação solar, diminuindo a fotossíntese.

Foi estudado o efeito da enzima,  $H_2O_2$  e enzima +  $H_2O_2$  na degradação do efluente têxtil, conforme resultados apresentados na Figura 30. O peróxido de hidrogênio é considerado um agente oxidante e também aplicado ao tratamento de efluentes têxteis. Mesmo sabendo que a enzima peroxidase é dependente do peróxido, para exercer sua função, foi feita avaliação para poder verificar o quanto ela pode atuar na ausência do mesmo. Nesse ensaio o efluente foi diluído 1:1.

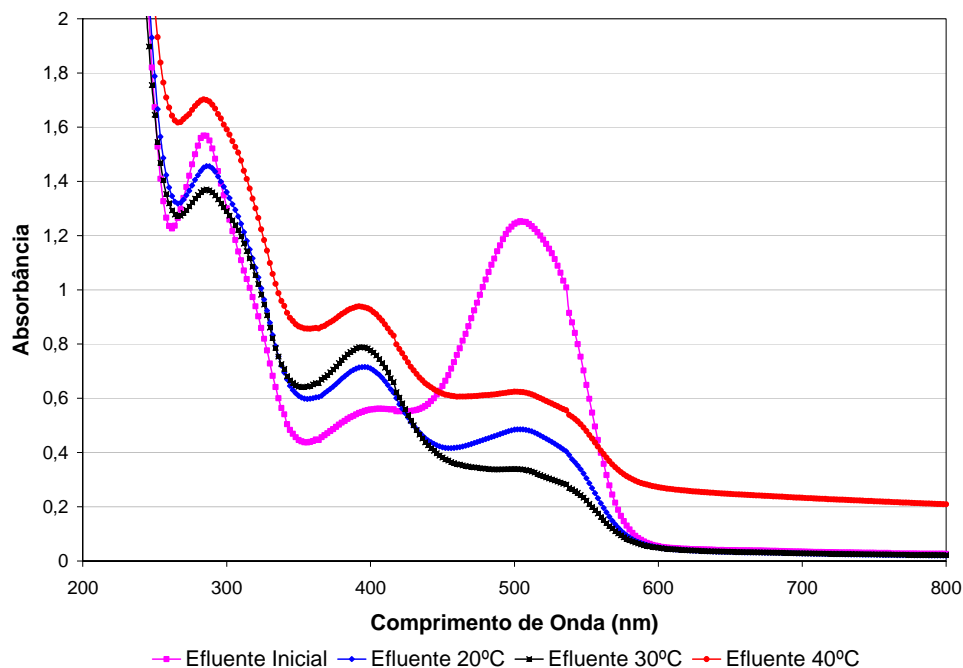


**Figura 30 - Espectro de absorção do tratamento de efluente têxtil com  $H_2O_2$ , enzima e enzima +  $H_2O_2$  por 90 minutos.**

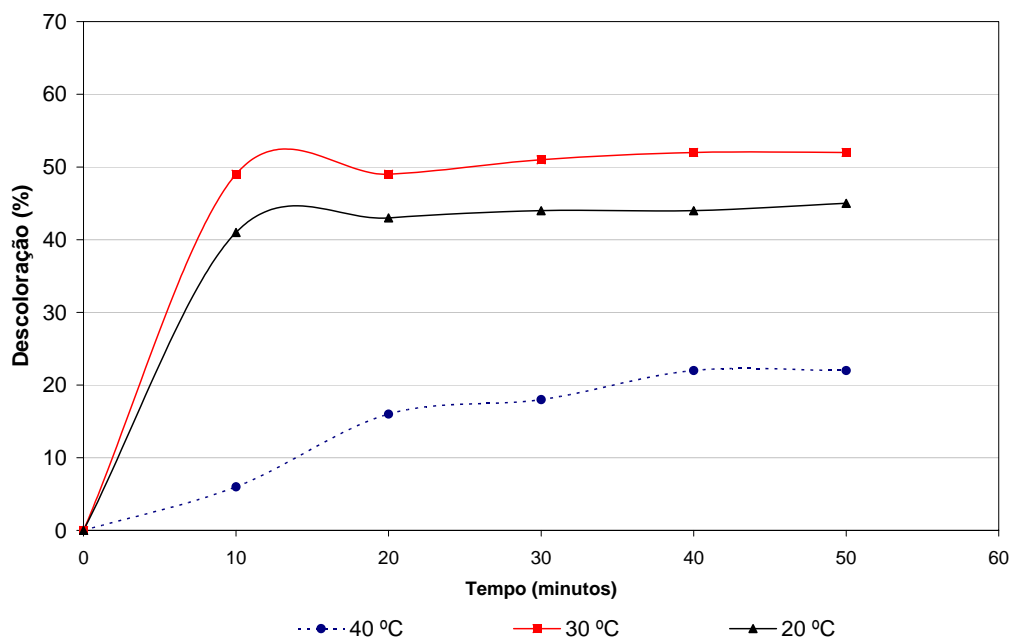
A atuação da enzima peroxidase na ausência de  $H_2O_2$  é muito inferior quando na presença do mesmo. O peróxido de hidrogênio age como um co-substrato que ativa a ação enzimática do radical de peroxidase, contribuindo no ciclo catalítico da peroxidase, para oxidar a enzima nativa em um intermediário enzimático que aceita o composto aromático para realizar sua oxidação para a forma de um radical livre.

Para a enzima na ausência de peróxido obteve-se 16% de descoloração, sendo que na presença do mesmo o resultado obtido foi de 52%. O peróxido sendo conhecido como agente oxidante e bastante aplicado no tratamento de efluentes têxteis não apresentou nenhuma descoloração.

A taxa de qualquer reação química aumenta com a elevação da temperatura, desde que esta elevação de temperatura não produza alterações no reagente ou no catalisador. As reações biológicas apresentam também a mesma tendência de acréscimo com a temperatura. No entanto, para estas últimas, existe uma temperatura ótima, acima da qual há um decréscimo da taxa, possivelmente devido à destruição das enzimas nas temperaturas mais elevadas. Foi feita a avaliação da descoloração do efluente têxtil, pela enzima HRP, na forma livre, para as temperaturas de 20, 30 e 40°C, conforme apresentado nas Figuras 31 e 32. Foi utilizado  $5 \times 10^{-3}$  mL de solução enzimática (29,85 U/mL)/ mL de efluente em estudo e  $2 \times 10^{-3}$  mmol L<sup>-1</sup>  $H_2O_2$ , o pH do efluente foi 5,0.



**Figura 31 - Espectros de absorção do efluente têxtil, após tratamento enzimático em diferentes temperaturas por 90 minutos.**



**Figura 32 - Efeito da temperatura, na descoloração do efluente têxtil.**

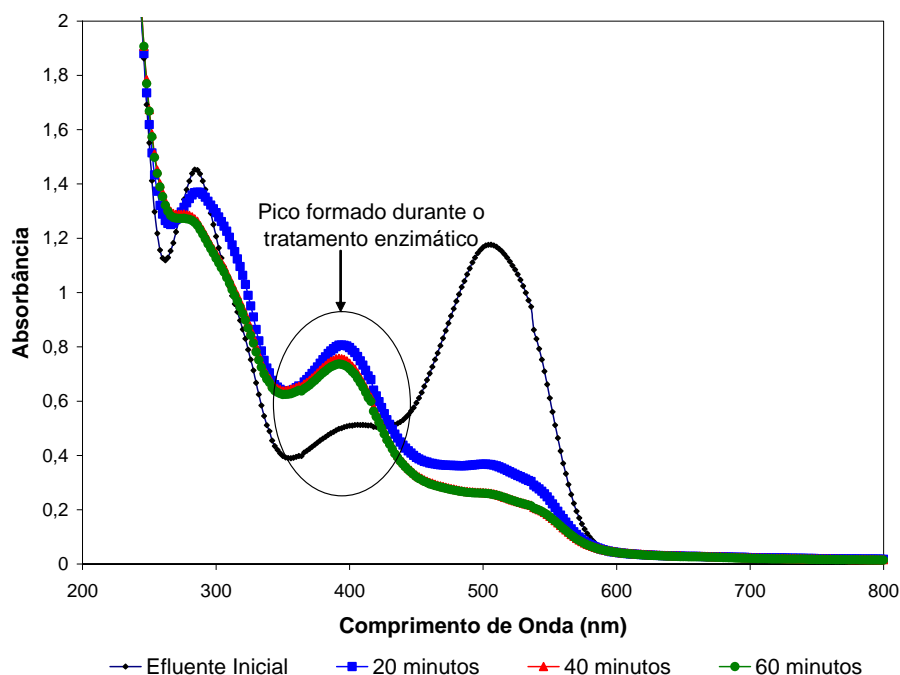
A temperatura foi um fator que influenciou significativamente na descoloração do efluente têxtil. Foi a 30°C que a enzima teve uma melhor atuação e maior descoloração (52%). Em 20°C a descoloração foi de 45% e, em 40°C foi de apenas 22%. Isso deve – se ao fato de que houve uma diminuição da eficiência, devido às condições

da solução em estudo não ser adequada para a atuação da enzima em temperaturas mais elevadas.

Uma forma usual de estimar a variação da taxa de reação em função da temperatura é através da formulação baseada na teoria de Von't Hoff–Arrhenius. Foi levado em consideração que a atuação da enzima para descoloração do efluente têxtil seguia uma cinética de primeira ordem, havendo um decaimento na concentração logo no primeiro minuto, permanecendo constante até o fim do ensaio.

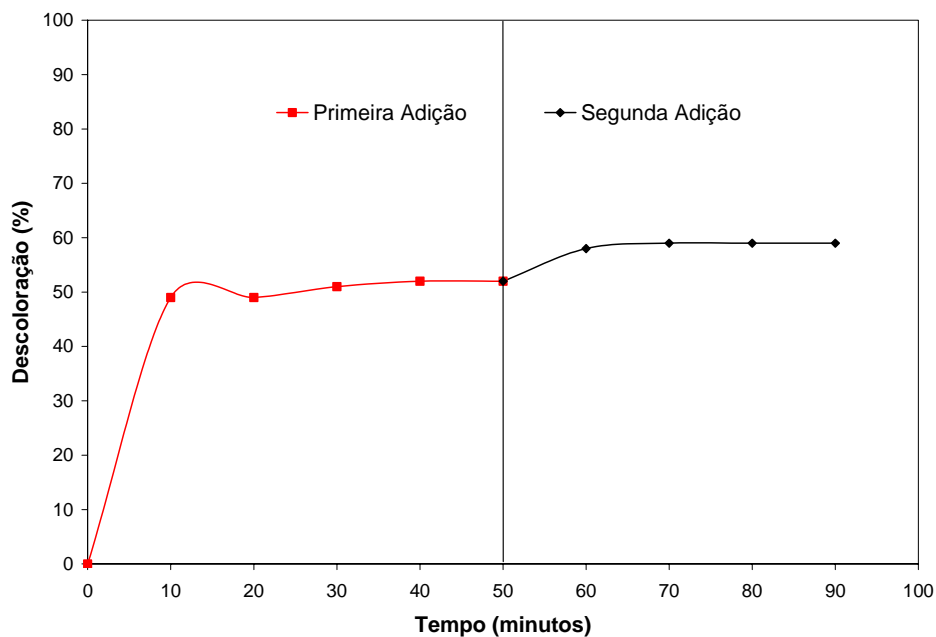
Para a temperatura de 30°C, foi obtida uma constante de reação de  $k_{T30^{\circ}\text{C}} = 0,068$  e para 20°C foi de  $k_{T20^{\circ}\text{C}} = 0,052$ . O coeficiente de Arrhenius, que expressa o quanto a reação é influenciada pela temperatura, foi determinado utilizando-se as constantes de reação previamente citadas para 20°C e 30°C, sendo seu valor de  $\theta = 1,026$  (constante). Este valor permite calcular a constante de reação para um efluente na faixa de temperatura entre 20°C e 30°C, mantidas as condições experimentais utilizadas.

Pode-se observar o surgimento de um pico na região de entre os comprimentos de onda 350 nm a 450 nm (Figuras 30 e 31). Uma explicação seria a formação de compostos intermediários, devido a uma degradação incompleta do efluente. Porém, estes compostos passam a ser degradados com o tempo, conforme se observa na Figura 33. A formação deste novo pico de absorção não interferiu no resultado da descoloração, devido à quantificação ser feita mediante a diferença do valor da área abaixo da curva.



**Figura 33: Espectros de absorção do efluente têxtil, ilustrando a formação de um novo pico, e a redução do mesmo em função do tempo.**

Com o intuito de analisar se a quantidade de enzima adicionada teria sido suficiente para se obter uma máxima descoloração, foram feitas duas adições de enzima, dobrando sua quantidade, como está apresentado na Figura 34.



**Figura 34 - Descoloração do efluente têxtil, temperatura 30°C, pH 5,0. Com primeira adição e segunda adição de enzima.**

Utilizando  $5 \times 10^{-3}$  mL de solução enzimática (29,85 U/mL)/ mL de efluente em estudo, foi obtido 52% de descoloração, quando essa quantidade foi dobrada a eficiência do processo foi de 59%. Como o acréscimo no percentual de descoloração foi de apenas 7%, conclui-se que não é economicamente viável a utilização de uma segunda adição de enzima.

Analisando a eficiência de descoloração da enzima, observou-se uma boa eficiência de remoção de cor do efluente. No entanto, a maioria dos trabalhos sobre tratamento de efluentes têxteis são realizados com o caldo bruto dos fungos, que geralmente possuem enzimas como lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase. Dessa forma, são várias as enzimas lignolíticas liberadas pelos fungos, que atuam de formas distintas sobre cada tipo de substrato.

### 5.2.1 Avaliação da toxicidade aguda do efluente têxtil.

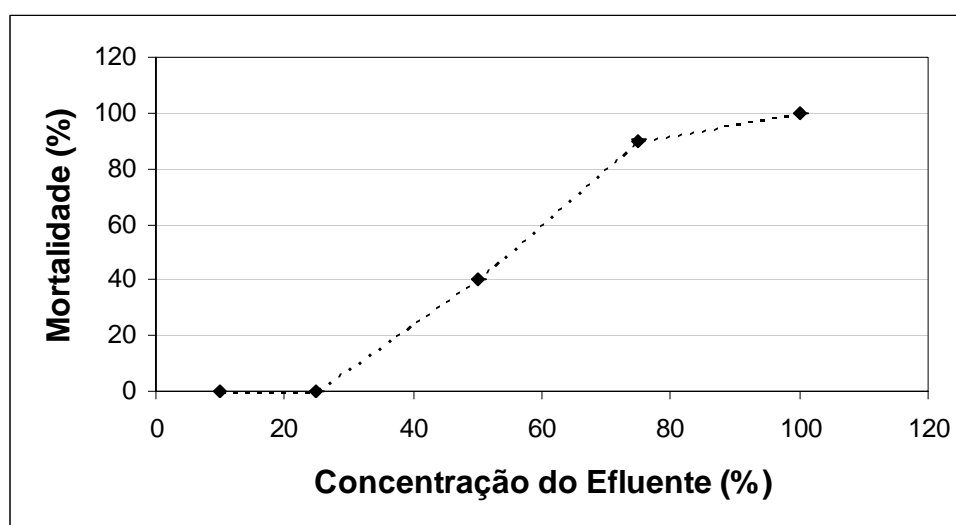
A resposta estabelecida para o teste de toxicidade aguda com *Artemia salina* foi à concentração letal média (CL<sub>50</sub>) capaz de matar 50% das larvas expostas durante 24h de exposição. O critério utilizado para o teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna* foi a Fator de diluição (FD), que estabelece a concentração do efluente que pode ocasionar a mortalidade ou imobilidade superior a 10% dos organismos expostos durante 48h nos diferentes concentrações efluentes.

Nas Figuras 35 e 36 e na Tabela 9, são apresentados os testes de avaliação de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia salina* no efluente têxtil não tratado e após o tratamento com a enzima HRP, respectivamente. Os Testes foram realizados em quadruplicata e os valores foram expressos como média  $\pm$ EPM (erro padrão médio), n=10.

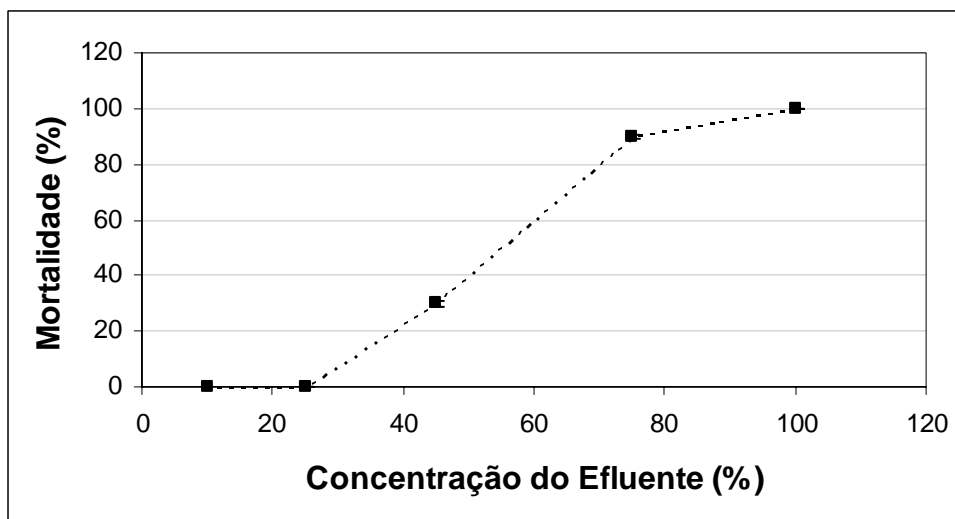
**Tabela 9: Testes de Toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia salina*, após 24 horas de incubação em diferentes concentrações de efluente.**

Concentração do Efluente (%)	Efluente não Tratado Mortalidade (%)	Efluente Tratado Mortalidade (%)
100	100±0	100±0
75	90±0,7071	90±0,5773
50	40±0,4082	30±1,0
25	0±0	0±0
10	0±0	0±0

Na Tabela 9, está representado a mortalidade do microcrustáceo *Artemia salina*, após 24 horas de incubação com o efluente têxtil bruto e após o tratamento enzimático, em diferentes concentrações. Foram consideradas mortas, quando não apresentavam nenhuma mobilidade durante 20 segundos de observação.



**Figura 35 - Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia salina*, após 24 horas de exposição, em diferentes concentrações de efluente não tratado.**



**Figura 36 - Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia salina*, após 24 horas de exposição, em diferentes concentrações de efluente tratado com a enzima HRP.**

Para o efluente não tratado, o  $CL_{50\%}$  foi de 55% e após o tratamento foi de 58,33%. Os resultados mostraram que não houve nenhuma mudança significativa, na toxicidade aguda, frente ao organismo teste, com relação ao efluente não tratado e após o tratamento enzimático.

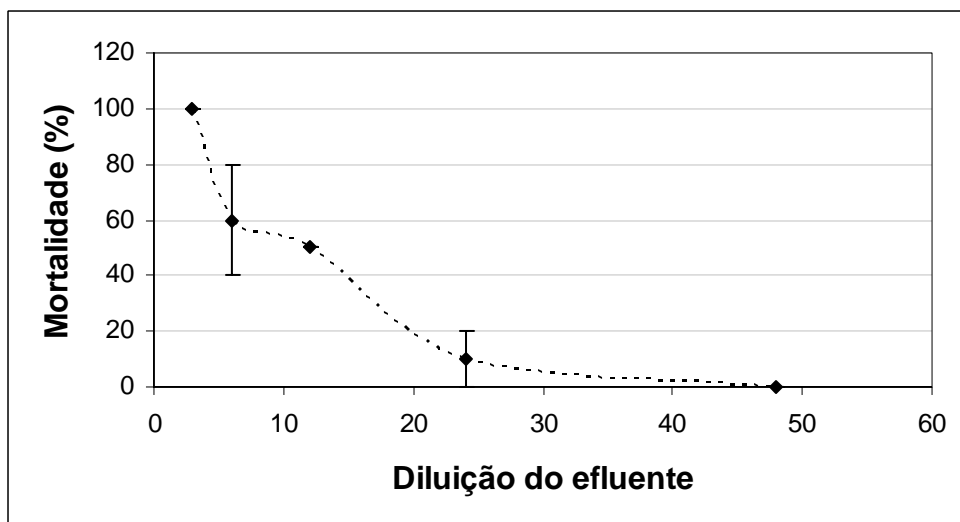
Nas Figuras 37 e 38, são apresentados os resultados dos testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Daphnia magna*, do efluente não tratado e após tratamento enzimático, respectivamente. Os testes foram realizados em duplicata e os valores foram apresentados como média  $\pm$ EPM,  $n=10$  e estão dispostos na Tabela 10.

**Tabela 10 - Resultado de *Daphnia magna* expostas no efluente têxtil bruto e tratado ( $n=10$  em duplicata).**

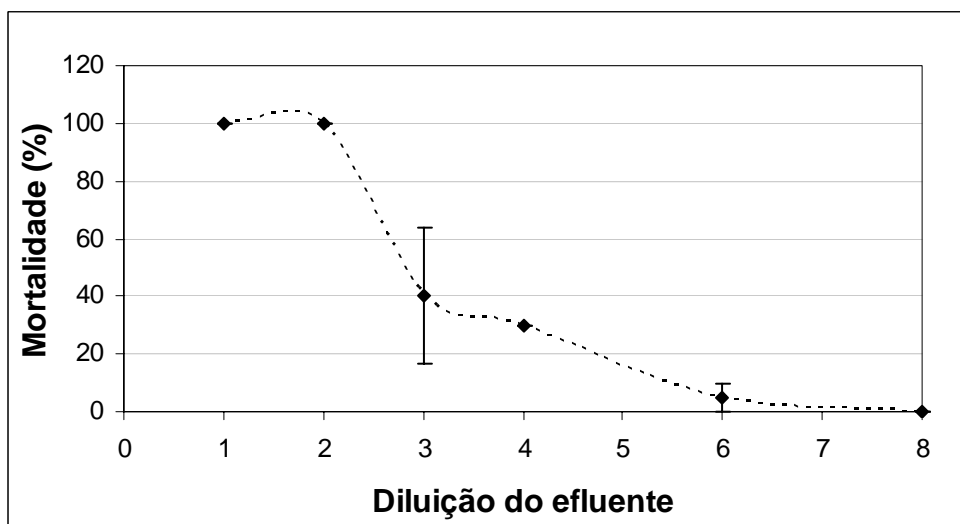
<i>Efluente não tratado</i>		<i>Efluente tratado</i>	
Diluição	Mortalidade (%)	Diluição	Mortalidade (%)
3	100 $\pm$ 0	1	100 $\pm$ 0
6	60 $\pm$ 20	2	100 $\pm$ 0
12	50 $\pm$ 0	3	40 $\pm$ 10
24	10 $\pm$ 10	4	30 $\pm$ 0
48	0 $\pm$ 0	6	5 $\pm$ 5
		8	0 $\pm$ 0
Fator de diluição = 24		Fator de diluição = 6	



Nas Figuras 37 e 38, está apresentado o número de organismos mortos (%), em função da diluição do efluente. Podemos verificar que o efluente não tratado apresentou um fator de diluição mais elevado do que o tratado, mostrando que houve redução da toxicidade após o tratamento enzimático.



**Figura 37 - Teste de toxicidade aguda para o microcrustáceo *D. magna*, após 48 horas de exposição em diferentes concentrações de efluente não tratado com enzima.**



**Figura 38 - Teste de toxicidade aguda para o microcrustáceo *D. magna*, após 48 horas de exposição em diferentes concentrações de efluente tratado por processos enzimáticos.**

A portaria 17, criada em 24 de abril de 2002, pela Fundação do Meio Ambiente (FATMA), estabeleceu os limites do fator de diluição (FD) de diferentes efluentes para a *Daphnia magna*. Para os efluentes têxteis, o fator de diluição deve ser 2 para que

possam ser eliminados, sem nenhum tratamento prévio. Isso quer dizer que, nesta concentração, não deve ser evidenciado nenhum efeito tóxico (imobilidade), nos organismos expostos.

Para os resultados obtidos no presente trabalho, o fator de toxicidade é representado pela diluição em que não ocorra mais do que 10% de mortalidade nos organismos após 48 horas de exposição. Para o efluente não tratado, o fator de toxicidade foi de 24 (FD), pois nesta diluição a média de mortalidade obtida foi de 10%. Desta forma o efluente analisado neste trabalho não pode ser eliminado nos corpos hídricos sem o devido tratamento.

Para o efluente tratado, o fator de toxicidade foi menor que 6 (FD), pois nesta diluição a média de mortalidade obtida foi de 5%. A partir destes resultados podem-se concluir que o fator de toxicidade do efluente após o tratamento enzimático é pelo menos 4 vezes menor do que o fator de toxicidade do efluente não tratado. Nesse sentido a remediação do efluente têxtil com a enzima HRP conseguiu reduzir significativamente a toxicidade do efluente em estudo, diminuindo fortemente a mortalidade dos dafnídeos expostos às amostras tratadas.

Villegas-Navarro *et al.* (1999) avaliaram a eficiência dos processos de tratamento de efluentes têxteis de 5 indústrias do México. Para tanto, os autores usaram *Daphnia. magna* para monitorar a toxicidade dos efluentes, antes e após o tratamento das empresas. Os resultados apresentados nesse estudo mostraram que, apesar de ter havido uma redução na toxicidade dos efluentes, os sistemas de tratamento adotados pelas empresas eram deficientes, uma vez que a CL<sub>50</sub> dos efluentes tratados variou de 66 a 14%.

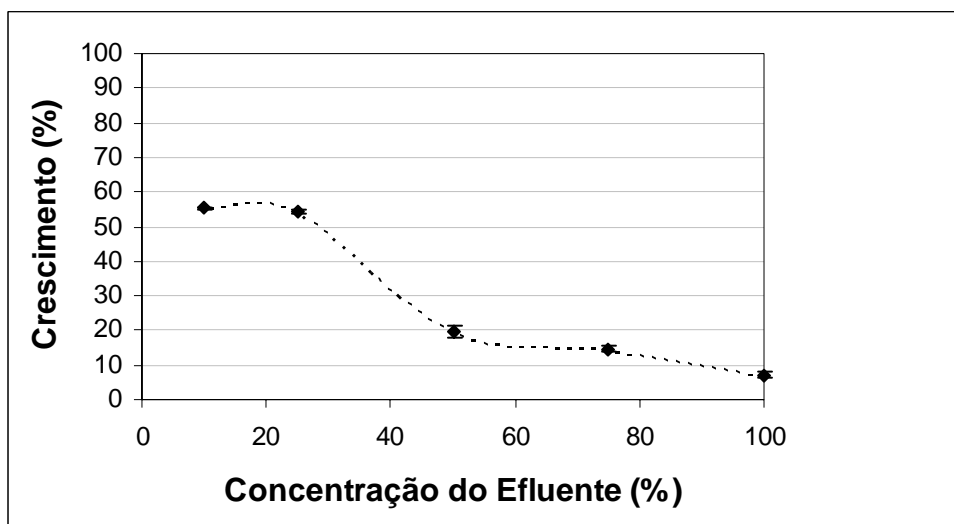
As plantas superiores têm sido empregadas para detectar compostos mutagênicos. Atualmente tem sido realizados ensaios com milho, tomate, soja, tabaco, cevada e ervilha. Alguns bioensaios usam raiz de cebola e feijão. Os efeitos mutagênicos sobre as proteínas podem ser detectados por alterações visíveis como: mudança de cor das pétalas, perda de clorofila, alterações de germinação e crescimento.

Uma forma rápida de avaliar a toxicidade de um efluente é o teste de inibição do crescimento da raiz de cebola. Foi avaliado o efeito da inibição do crescimento da raiz de cebola quando exposta ao efluente têxtil bruto e após o tratamento, durante exposição de 8 dias. Para o controle negativo foi utilizada água mineral, e para o positivo foi sulfato de cobre (0,1g/L de CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O). Os valores da Tabela 11 foram expressos como média  $\pm$ EPM (erro padrão médio), n=3.

**Tabela 11: Inibição do crescimento da raiz de cebola (*Allium cepa*), expostas a 8 dias em diferentes concentrações de efluente bruto e após tratamento.**

Amostra	Crescimento médio (cm)	Inibição do crescimento (%)
Controle negativo	9,5±0,5	0,00%
Controle positivo	0	100%
Efluente não tratado 10%	4,75±0,25	50%
Efluente tratado 100%	0,75±0,75	92,875%
Efluente tratado 75%	1,40±1,100	85,27%
Efluente tratado 50%	1,85±1,65	80,53%
Efluente tratado 25%	5,15±0,650	45,79%
Efluente tratado 10%	5,25±0,250	44,74%

Na Figura 39, é apresentada a percentagem de crescimento da raiz de cebola, nas diferentes concentrações de efluente tratado. O pH do ensaio ficou entre 4 e 6, a temperatura foi a ambiente, e o ensaio foi realizado em local abrigado da luz durante os 8 dias de exposição.



**Figura 39 - Crescimento da raiz de cebola em diferentes concentrações de efluente tratado.**

A maior inibição do crescimento da raiz ocorreu em cebolas expostas a 100% do efluente tratado (inibição de 92,875%), e a menor inibição foi observada na

concentração de 10% (inibição de 44,74%), quando comparado ao controle (água mineral). A partir desses resultados foi calculado o  $CL_{50\%}=29\%$ .

As cebolas que ficaram expostas ao efluente não tratado apresentaram crescimento da raiz apenas na concentração de 10%, onde foi obtido 50% de inibição. Sendo assim, não foi possível estabelecer o  $CL_{50\%}$ , uma vez que houve crescimento apenas em uma única concentração.

Os resultados dos testes de toxicidade aguda para o efluente têxtil, com os bioindicadores *Artemia salina*, *Daphnia magna* e inibição do crescimento da raiz de cebola (*Allium cepa*) mostraram que houve uma redução da toxicidade do efluente têxtil, após o tratamento com a enzima *Horseradish* peroxidase (HRP). Cada bioindicador utilizado respondeu de forma diferente quando em contato com o efluente em estudo, porém isto está relacionado à sensibilidade do organismo aos compostos tóxicos.

A seguir serão apresentadas as principais conclusões obtidas neste trabalho, bem como sugestões para trabalhos futuros.

## 6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os ensaios de descoloração com o corante Turqueza Remazol G 133% mostraram que as condições ótimas de atuação da enzima, nas quais se obteve descoloração foram: pH na faixa de 4,0 e 5,0, quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $2\text{mmol L}^{-1}$ ) de 0,1 mL/100 mL solução de corante em estudo, e de enzima  $5 \times 10^3$  mL de enzima/ mL de solução (29,85 U/mL), concentração de corante de 100mg/L e temperatura de 30°C.

Os experimentos de descoloração utilizando a enzima peroxidase (HRP) mostraram diferentes resultados para cada corante estudado. Para os corantes Azul Lanaset 2R e Turqueza Remazol G 133%, foi obtida uma descoloração 94 e 59%, respectivamente. Para o Preto Remazol B não houve descoloração; isto se deve ao fato de este corante ser mais recalcitrante para a enzima do que os demais. A velocidade de descoloração foi variável para cada corante devido às diferenças estruturais.

Nos resultados de toxicidade dos corantes, utilizando *Artemia salina* como organismo teste, pode-se observar que a toxicidade do corante após o tratamento enzimático foi maior do que antes do tratamento. O mesmo também foi obtido no ensaio com a inibição do crescimento de raiz de cebola. Estes resultados devem ter sido encontrados devido à possível formação de espécies intermediárias mais tóxicas que o composto de partida.

No tratamento do efluente têxtil, a temperatura em que a enzima teve uma melhor atuação foi a 30°C, com 52% de descoloração. Foi observada também a formação de um novo pico de absorção entre os comprimentos de onda 350-450 nm. A toxicidade do efluente após o tratamento foi reduzida em comparação ao efluente bruto, frente aos três organismos estudados, sendo que cada um respondeu de maneira diferente, devido à sensibilidade dos organismos aos compostos tóxicos.

A seguir são apresentadas algumas sugestões para desenvolvimento de trabalhos futuros:

- Trabalhar com a enzima imobilizada;
- Estudar a atuação da enzima em diferentes classes de corantes;
- Estudar os possíveis intermediários formados a partir da degradação dos corantes têxteis;
- Estudar outras enzimas, que podem atuar na descoloração de corantes e efluentes têxteis.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADULLA, E.; TZANOV, T.; COSTA, S.; ROBRA, K.H.; CAVACO-PAULO, A. AND GUBITZ, G.M. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. **Applied and Environmental Microbiology**, V. 66, p. 3357 – 3362, 2000a.

ABADULLA, E.; ROBRA, K-H.; GÜBITZ, G.M; SILVA, L.M AND CAVACO-PAULO, A. Enzymatic decolorization of Textile Dyeing Effluents. **Textile Research Journal**, V.70, p. 409 – 414, 2000b.

ABRAHÃO, J.A; SILVA, G.A; Influência de Alguns Contaminantes na Toxicidade Aguda de Efluentes da Indústria Têxtil. **Revista Química Têxtil**, nº 67, p.8-34, 2002.

ADLER, P.R; ARORA, R.; EL-GHAOUTH, A.; GLENN, D.M; SOLAR, J.M. Bioremediation of phenolic compound from water with plant root surface peroxidases. **Journal Environmental. Qual.** 23, p. 1113 – 1117, 1994.

AQUARONE, E; BORZANI, W; LIMA, U.A; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. Volume 3, 2001.

ANDER, P., MARZULLO, L. Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidases as related to lignin degradation. **Journal Biotechnology**, V. 53, p. 115-131, 1997.

ARAMBASIC, M. B.; BJELIC, S.; SUBAKOV, G. Acute toxicity of heavy metals, phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L. and *Daphnia magna* St.: comparative investigation and the practical applications. **Water Research**, V. 29, p. 497-503, 1995.

ARAÚJO, M.; CASTRO, E.M.M. **Manual de Engenharia Têxtil**. Volume 1. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, p.694, 1984.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: **Água – ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia* sp (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro, 1993.

AZMI,W; SANI,R.K; BARNEJEE,U.C. Biodegradation of Triphenylmethane Dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, V. 22, 185-191, 1998.

BALAN, D.S.L.; MONTEIRO, R.T.R. Decolorization of textile indigo dye by lignolytic fungi. **Journal of Biotechnology**, V. 89, p. 141-145, 2001.

BALAN, D.S.L. Biodegradação e Toxicidade de Efluentes Têxteis. **Revista Química Têxtil**, V. 22, p.26-31, 1999.

BANAT, I.M; NIGAM, P; SINGH, D; MARCHANT, R. Microbial Decolorization of Textile-Dye-Containing Effluents: A Review. **Bioresource Technology** , V. 58, p.217-227, 1996.

BENASSI, J.C. **O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de efluente de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

BEYDILLI, M. I; PAVOLOSATHIS, S.G; TINCHER, W.C. Decolorization and toxicity screening of selected reactive azo dyes under methanogenic conditions. **Water Science and Technology**, V. 38, p. 225-232, 1998.



BHUNIA, A.; DURANI, S.; WANGIKAR, P. *Horseradish* peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. **Biotechnology. and Bioengineering**, V. 72, p. 562 – 567, 2002.

BRAILE, P.M. E CAVALCANTI, J.E.W.A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. CETESB, São Paulo – Brasil, 1993.

BRÁS, R; DIAS,J; REGO,G; BAPTISTA,N; GONÇALVES, I.C; USSMAN, M.H. Degradação de Corantes Azo por Processos Biológicos. **Revista Química Têxtil**, nº68, p. 5-10, 2002.

BROWN, M.A.; DE VITO, S.C. Predicting azo dye toxicity. Critical. **Reviews in Environmental Science and Technology**, 23, p. 249 – 324, 1993.

CAMMAROTA,M.C; COELHO, M.A.Z. Tratamento Enzimático Para Remoção de Cor de Efluentes da Indústria Têxtil. **Revista Química Têxtil**, nº65, p. 40-47, 2001.

CASTILO, E., DOSSAT, V., MARTY, A., CONDORET, J.S., COMBES, D. The role of silica in lipase-catalyzed esterification reactions of high-polar substrates. *Journal Organic Chemical*. V.74, p. 77-85, 1997.

CORREIA, V.M.; STEPHENSON, T.; JUDD, S.J. Characterization of textile wastewaters – A Review. **Environmental Technology**, 15, p. 917 – 929, 1994.

CHEN, K-U; JANE, Y-W.; LIOU, D-J ; HWANG, S-C.J. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. **Journal of Biotechnology**, V. 101, p. 57-68, 2003.

CHIVUKULA, M.I.; RENGANATHAN, V. Phenolic azo dye oxidation by lacase from *Pyricularia oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology** 61, p. 4374 – 4377, 1995.

CRIPPS, C; BUMPUS, J.A ; AUST, S. D. Biodegradation of Azo and Heterocyclic Dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, V. 56, p. 1114 – 1118, 1990.

DEURZEN, P.J.V.M., RANTWIJK, F.V, SHELDON, R.A. Selective oxidations catalyzed by peroxidases. **Tetrahedron**. V. 53, p. 13183-13220, 1997.

DURÁN, N. Applications of Oxidative Enzymes in Waste Treatment. **Wastewater Treatment Using Enzymes 2**, p. 41 -51, 2003.

DURÁN, N.; BROMBERG, N.; KUNZ, A. Kinetic studies on veratryl alcohol transformation by *Horseradish* peroxidase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 84, p.279-286, 2001.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase – like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, nº 714, p. 1-17, 2000 a.

DURÁN, N., MORAIS, S.G, FREIRE, R.S. Degradation and toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation processes. **Chemosphere**, V. 40, p. 369-373, 2000 b.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. **Biodegradação da lignina e tratamento de efluentes por fungos lignolíticos**. Microbiologia Ambiental, EMBRAPA, CNPMA, Jaguariúna, p. 269-292, 1997.

EPA – Environmental Protection Agency. **Profile of the Textile Industry**. Washington, September, 1997.

FATMA (Fundação de Meio Ambiente). **Estabelece os limites máximo de toxicidade aguda para efluentes de diferentes origens e dá outras providências. Portaria n. 17, de 18 de abril de 2002**. Disponível em: [www.fatma.sc.org.br/temas/tema3/PORTARIA\\_17\\_2002.htm](http://www.fatma.sc.org.br/temas/tema3/PORTARIA_17_2002.htm). Acesso em: 21 de dezembro de 2005.

FERRER, I.; DEZOTTI, M. AND DURÁN, N. Decolorization of Kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidases and Horseradish Peroxidase. **Biotechnology Letters**, V.13, p. 577 – 582, 1991.

FORGACS, E.; CSERHÁTI, T.; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewater: a review. **Environment International**, V. 30, p. 953 – 971, 2004.

GONÇALVES, M.S.T.; OLIVEIRA-CAMPOS, A.M.F.; PINTO, E.M.M.S.; PLASÊNCIA, P.M.S. Photochemical treatment of solutions of azo dyes containing TiO<sub>2</sub>. **Chemosphere** 39, p. 781 – 786, 1999.

GOTTLIEB, A.; SHAW, C.; SMITH, A.; WHEATLEY, A.; FORSYTHE, S. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourization. **Journal of Biotechnology**. V. 101, p. 49-56, 2003.

GUARANTINI, C.I. E ZANONI, V.B. Corantes Têxteis. **Revista Química Nova**, V. 23, p. 71- 78, 2000.

GÜBITZ, G.M. Uma introdução à biotecnologia e a enzimologia e suas aplicações na indústria têxtil. **Revista Química Têxtil**, nº 73, p. 54-68, 2003.

KARAM, J; NICELL, J.A. Potential Application of Enzymes in Waste Treatment. **Journal Chemical Technology Biotechnology**. V.69, p. 141 – 153, 1997.

KIM,G.Y.; LEE, K.B.; CHO, S.H.; SHIM, J.; MOON, S.H. Electroenzymatic degradation of azo dye using an immobilized peroxidase enzyme. **Journal of Hazardous Materials**, V.126, p 183-188, 2005 .

KIRBY, N.; MC-MULLAN, G.; MARCHANT, R. Decolourization of an artificial textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology Letters**, V.17, p. 761-764, 1995.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S.G; DURÁN, N. Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis. **Revista Química Nova**, V. 25, p. 78-82, 2002.

KUNZ, A. **Remediação de efluente Têxtil: Combinação entre processo químico (ozônio) e biológico (*P. Chrysosporium*)**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1999.

KNAPP,J.S; NEWBY, P.S. The decolourisation of a chemical industry effluent by white rot fungi. **Water Research**, V. 33, p. 575 – 577, 1999.

LEDAKOWICZ, S.; GONERA, M. Optimisation of oxidants dose for combined chemical and biological treatment of textile wastewater. **Water Research**. V.33, p. 2511-2516, 1998.

LEE, B., LIAW, W., LOU, J. Photocatalytic decolorization of methylene blue in aqueous TiO<sub>2</sub> suspension. **Environmental Engineer Science**, V. 16, p. 165-175, 1999.

LORA, E.E.S. **Prevenção e Controle da Poluição em Setores Energético, Industrial e de Transporte**. ANEEL, Brasília, 503p, 2000.

MARCANTI-CONTATO, I.; CORSO, C.R. Studies of adsorptive interaction between *Aspergillums niger* and the reactive azo dye Procion Blue MXG. **Eclética Química**, V. 21, p. 97-102, 1996.

MATTHEWS, R.S. *Artemia salina* as a test organism for measuring superoxide-mediated toxicity. **Free Radical Biology & Medicine**, V. 18, p. 919-922, 1995.

MARTINS, M. A. M.; LIMA, N.; SILVESTRE, A.J.D.; QUEIROZ, M.J. Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. **Chemosphere**, V. 52, p. 967 – 973, 2003.

MOHAN, S.V.; PRASAD, K.K.; RAO, N.C.; SARMA P.N. Acid azo dye degradation by free and immobilized *Horseradish* peroxidase (HRP) catalyzed process. **Chemosphere**, V. 58, p. 1097 – 1105, 2005.

NICELL, J.A; BEWTRA, J.K, BISWAS, N.; TAYLOR, E. Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater. **Water Research**, V. 27, p. 1629 – 1639, 1993.

NIGAM, P.; BANAT, I. M.; OXSPRING, D.; MARCHANT, R.; SINGH, D.; SMYTH, W.F. A new facultative anaerobic filamentous fungus capable of growth on recalcitrant textile dyes as sole carbon source. **Microbios**, V.84, p. 171-185, 1995.

NIGAM, P.; BANAT, I.M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo, and reactive dyes. **Process Biochemistry**, V. 31, p. 435-442, 1996.

NIGAM, P., ROBINSON T., MCMULLAN, G., MARCHANT, R. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, V. 77, p. 247-255, 2001.

OLLIKKA, P.; ALHONMAKI, K.; LEPPANEN, V.M.; GLUUMOFF, T.; RAIJOLA, T.; SUOMINEN, I. Decolourization of azo triphenylmethane, heterocyclic and polymeric dyes by the lignin peroxidase isozymes from *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental Microbiology**, V.59, p. 4010-4016, 1993.

PERALTA-ZAMORA, P.; GIMENES, I.F.; CORDI, L.; REYES, J.; ALVES, O.L. AND DURÁN, N. **Remediation of effluents from the pulp and paper industry using *Horseradish* Peroxidase immobilized on ceramic material**. LABS 3- Third Latin American biodegradation & biodeterioration Symposium, Florianópolis-Brazil, 1998.

PERALTA-ZAMORA, P.; PEREIRA, C.M.; TIBURTIUS, E.R.L; MORAES, S.G.; ROSA, M.A; MINUSSI, R.C. AND DURÁN, N. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. **Applied Catalysis B: Environmental**, V. 42, p. 131 – 144, 2003.

PERALTA-ZAMORA, P.; TIBURTIUS, E.R.L; MORAES, S.G; DURÁN, N. Degradação Enzimática de Corantes Têxteis. **Revista Química Têxtil**, nº68, p.32-38, 2002.

PERALTA-ZAMORA, P; KUNZ, A; MORAES, S.M; PELEGRINI, R; MOLEIRA, P.C; REYES, J; DURÁN, N. Degradation of reactive dyes. A comparative study of ozonation, enzymatic and photochemical processes. **Chemosphere**, V.38, p. 835-852, 1999.

PERES, C.S.; ABRAHÃO, A.J. Características e sistemas de tratamento de águas residuais das indústrias têxteis. **Revista Química Têxtil**, V.21, p. 22–39, 1998.

REGALADO, C.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B.E.; DUARTE-VÁZQUEZ, M.A. **Biotechnological applications of peroxidases**. *Phytochemistry Reviews* 3, p. 243 – 256, 2004.

ROBINSON,T; CHANDRAN,P; NIGAM,P. Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textile dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, V. 29, p. 575-579, 2001.

RODRIGUES, T.A. **Estudo da Interação Biosortiva entre o Corante Reativo Procion Blue MXG, e as Linhagens CCB 004, CCB 010 e CCB 650 de *Pleurotus ostreatus* Paramorfogênico.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

ROSALEN, I.A; MONTEIRO, R.T.R; DELLAMATRICE, P.M; KAMIDA, H.M. Biodegradação de Efluente Têxtil e Nove Corantes Técnicos Utilizando Fungos Basidiomicetos. **Revista Química Têxtil**, nº 76, p.44-52, 2004.

SANIN, L.B.B. A Indústria Têxtil e o Meio Ambiente. **Revista Química Têxtil**, nº 46, p. 13-34, 1997.

SELVAM, K; SWAMINATHAM, K; CHAE, K-S. Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora sp.* **Bioresource Technology**,V.88, p. 115-119, 2003.

SOUZA, K.V; TIBURTIUS, E.L; WYPCH,F; MORAES, S.G; CAMARGO, F.A; DURÁN, N.E; ZAMORA, P.P. Degradação de Soluções Aquosas de Corantes Reativos Utilizando-se Processo de Fotocatálise Heterogênea. **Revista Química Têxtil**, nº76, p. 58 – 63, 2004.

SPADARO, J.T.; GOLD, M.H.; RENGANATHAN, V. Degradation of Azo Dyes by the Lignin-Degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, V. 58, p. 2397 – 2401, 1992.

STEINHART, M. R. V. Auxiliares têxteis do ponto de vista dos tensoativos. **Revista Química Têxtil**, V.61, p.76-80, 2000.

SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production of phenoloxidas and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, V.81, p. 234-240, 1989.

SWAMY,J; RAMSAY,J.A. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. **Enzyme Microbial Technology**, V. 24, 130-137, 1999.

TIMOFEEVSKI, S.L., READING, N.S., AUST, S.D. Mechanisms for protection against inactivation of manganese peroxidase by hydrogen peroxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. V. 356, p. 287-295, 1998.

TOYOBO DO BRASIL. Enzima *Horseradish* peroxidase doada pela: **Toyobo Do Brasil**. Fábrica Bioquímica, Rua Padre Bento, 858, CEP: 12326-400, Salto, São Paulo, 2005.

VANDEVIVERE, P.C.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE, W. Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, V.72, p. 289 – 302, 1998.

VILLEGAS-NAVARRO, A., GONZÁLES, M.C.R, LÓPEZ, E.R., DOMINGUEZ, R.A., MARÇAL, W.S. Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of toxicity and treatment efficacy of textile wastewaters. **Environment International**, V. 25, p. 619-624, 1999.

WANG, Y., YU, J. Adsorption and degradation of synthetic dyes on the mycelium of *Trametes versicolor*. **Water Science Technology**, V. 38, p. 233-238,1998.



WALKER, G.M; WEATHERLEY, L.R. Biodegradation and Biosorption of Acid Anthraquinone Dye. **Environmental Pollution**, V. 108, p. 219-223, 2000.

WILBERG, K.Q. Oxidação de compostos fenólicos em solução aquosa com enzima peroxidase de extratos vegetais. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.